

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
*pharmazentrum frankfurt*  
Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie

# Untersuchungen über die Regulation der Genexpression von Interleukin-18- Bindungsprotein und Interleukin-18

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von

**Markus Bosmann**

**aus Kassel**

Frankfurt am Main, 2004

Dekan:	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Korreferent:	Prof. Dr. B. Zwißler
Tag der mündlichen Prüfung:	14. Februar 2005

*„Wenn du es mir sagst – so werde ich es vergessen.  
Wenn du es mir zeigst – so werde ich es mir vielleicht behalten können.  
Wenn du es mich aber selber tun lässt – so werde ich es verstehen.“*

Célestin Freinet (1896 – 1966)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.2 Zytokine: Botenstoffe des Immunsystems .....	3
1.3 Interleukin-18 (IL-18) .....	5
1.4 Interleukin-18-Bindungsprotein (IL-18BP) .....	12
1.5 Aufgabenstellung .....	18
 <b>2 Material und Methoden</b> .....	 <b>20</b>
2.1 Zellkulturen .....	20
2.1.1 Humane DLD-1 Kolonkarzinomzellen .....	20
2.1.2 Primäre humane Mesangiumzellen (hMZ) .....	22
2.1.3 Primäre humane Fibroblasten .....	22
2.1.4 Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) .....	22
2.1.5 Kokulturen von PBMCs/DLD-1 und PBMCs/hMZ .....	23
2.1.6 Humane Mesangium-Zelllinie .....	24
2.1.7 U937 Monozyten-Zelllinie .....	24
2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	24
2.2.1 Das Funktionsprinzip des ELISA .....	24
2.2.2 Interferon- $\gamma$ ELISA .....	26
2.2.3 Interleukin-8 ELISA .....	27
2.3 Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) .....	27
2.3.1 Das Prinzip der semiquantitativen RT-PCR .....	27
2.3.2 RNA-Isolation, Reverse Transcription und PCR .....	29
2.3.3 PCR Protokoll für GAPDH .....	32
2.3.4 Etablierung einer RT-PCR für Interleukin-18-Bindungsprotein .....	32
2.3.5 PCR Protokoll für Interleukin-18 .....	36
2.4 RNase Protection Assay .....	36
2.4.1 Das Prinzip des RNase Protection Assay .....	36
2.4.2 Interleukin-18-Bindungsprotein und GAPDH RNase Protection Assay .....	37
2.5 Western Blot .....	38
2.5.1 Das Prinzip des Western Blot .....	38
2.5.2 Herstellung von Proteinlysaten für den Western Blot .....	40
2.5.3 Präzipitation von Zellkulturüberständen für den Western Blot .....	41

2.5.4 Gelelektrophorese, Blotten und Immundetektion .....	42
2.5.5 Interleukin-18 Western Blot .....	45
2.5.6 Etablierung eines Interleukin-18-Bindungsprotein Western Blot.....	45
2.6 Statistik.....	46
2.7 Reagenzien .....	46
2.8 Computer Software.....	47
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
3.1 Untersuchungen zur Expression von Interleukin-18-Bindungsprotein auf mRNA-Ebene .....	48
3.1.1 Nachweis einer konstitutiven Expression von mRNA für Interleukin-18-Bindungsprotein in verschiedenen Zelltypen.....	48
3.1.2 Interferon- $\gamma$ induziert einen Anstieg an Interleukin-18-Bindungsprotein mRNA in mehreren Zelltypen.....	50
3.1.3 LPS induziert einen Anstieg der Interleukin-18-Bindungsprotein mRNA in humanen Mesangiumzellen.....	56
3.1.4 Weitere untersuchte Entzündungsmodulatoren zeigten keinen Einfluss auf die Interleukin-18-Bindungsprotein mRNA Expression .....	58
3.1.5 Indirekte Kokulturen: Mit IL-12/IL-18 stimulierte PBMCs vermitteln die IL-18BP mRNA Expression in benachbarten DLD-1 Zellen oder humanen Mesangiumzellen.....	63
3.2 Untersuchungen über Interleukin-18-Bindungsprotein auf Protein-Ebene.....	68
3.2.1 Interferon- $\gamma$ bewirkt die Freisetzung von Interleukin-18-Bindungsprotein durch DLD-1 Zellen .....	68
3.3 Untersuchungen über Interleukin-18 .....	71
3.3.1 Humane Mesangiumzellen exprimieren keine mRNA für Interleukin-18.....	71
3.3.2 DLD-1 Zellen besitzen mRNA für Interleukin-18 sowie intrazelluläres proIL-18 .....	72
3.3.3 Keine Anhaltspunkte für eine Regulation von Interleukin-18 in DLD-1 Zellen.....	73
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>76</b>
4.1 Zellen mit der Fähigkeit zur Expression von Interleukin-18-Bindungsprotein.....	76
4.2 Regulation von IL-18BP durch Interferon- $\gamma$ : Die Entdeckung eines neuen negativen Rückkopplungsmechanismus .....	77
4.3 Einfluss von LPS und anderer Faktoren auf die Interleukin-18-Bindungsprotein Genexpression .....	83
4.4 Veränderte Genexpression von Interleukin-18-Bindungsprotein bei Krankheiten ....	84
4.5 Ausblick .....	86

5 Zusammenfassung .....	90
6 Literatur .....	92
7 Anhang .....	103
7.1 Danksagung .....	103
7.2 Wissenschaftliche Publikationen .....	105
7.3 Lebenslauf .....	106
7.4 Ehrenwörtliche Erklärung .....	108

# Abkürzungsverzeichnis

## Allgemeine Abkürzungen

[ <sup>32</sup> P]rUTP	<sup>32</sup> Phosphor radioaktiv markiertes Uridintriphosphat
<sup>125</sup> I-IL-18	<sup>125</sup> Iod radioaktiv markiertes Interleukin-18
ATRA	All-Trans-Retinsäure
C/EBPβ	CCAAT / enhancer binding protein beta
CD4 <sup>+</sup>	Cluster of Differentiation 4
CD8 <sup>+</sup>	Cluster of Differentiation 8
cDNA	complementary DNA; komplementäre DNA
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
COX-2	Cyclooxygenase-2
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dBcAMP	Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC-H <sub>2</sub> O	Wasser mit Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguadinintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic Acid; Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FasL	Fas Ligand
FCS	Fetal Calf Sera; fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
<i>HIV</i>	<i>Human-Immundefizienz-Virus</i>
hMZ	humane Mesangiumzellen
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Endothelzellen aus Nabelschnurvenen
i. p.	intra peritoneal
i. v.	intra venös
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1; Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus; insulinabhängiger Diabetes mellitus
IFN <sub>γ</sub> ; Interferon-γ	Interferon-gamma
IgG; IgM; IgA; IgE	Immunglobulin der Klasse G, M, A, E
IL-1	Interleukin-1
IL-1β	Interleukin-1 beta
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-18	Interleukin-18
IL-18BP	Interleukin-18-Bindungsprotein
IL-18BP <sub>a</sub>	Interleukin-18-Bindungsprotein Isoform a
IL-18BP <sub>c</sub>	Interleukin-18-Bindungsprotein Isoform c



IL-18BP-Fc	Fusionsprotein aus IL-18BP und der Fc-Untereinheit von IgG1
IL-18R	Interleukin-18-Rezeptor
IL-18R $\alpha$	Interleukin-18-Rezeptoruntereinheit-alpha
IL-18R $\beta$	Interleukin-18-Rezeptoruntereinheit-beta
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-8	Interleukin-8
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase
IRF-1	Interferon-Regulator-Faktor-1
KG-1 Zellen	eine Zelllinie der humanen akuten myeloischen Leukämie
LIF	Leukämie-Inhibitions-Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
mIL-18BP	murines Interleukin-18-Bindungsprotein
MIP-1 $\alpha$	Makrophagen-inflammatorisches-Protein-1-alpha
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
mRNA	messenger Ribonucleic Acid; Boten-Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NOD-Mäuse	nonobese diabetic mice
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; Nicht-Steroidale Antiphlogistika
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
PBMCs	human Peripheral Blood Mononuclear Cells; humane mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphate Buffered Saline; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerasekettenreaktion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) Puffer
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A2
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
RA	Rheumatoide Arthritis
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SCID-Mäuse	Mäuse mit Severe Combined Immunodeficiency
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SV40	Simianvirus Typ 40
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor-beta
Th1-Zellen	T-Helfer-Zellen, Subtyp 1
Th2-Zellen	T-Helfer-Zellen, Subtyp 2

TLR4	Toll-Like Rezeptor 4
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAF-6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter-Faktor-6
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U937 Zellen	humane myeloide Zelllinie
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1

## Einheiten

$\mu\text{m}$	Mikrometer
mm	Millimeter
cm	Zentimeter
$\mu\text{l}$	Mikroliter
ml	Milliliter
l	Liter
pM	Pikomolar
nM	Nanomolar
$\mu\text{M}$	Mikromolar
mM	Millimolar
M	Molar, Molarität
mmol	Millimol
N	Normalität
s	Sekunde(n)
min	Minute(n)
h	Stunde(n)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
bp	Basenpaare
kbp	Kilobasenpaare
pg	Pikogramm
ng	Nanogramm
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
kDa	Kilodalton
cpm	counts per minute, Zerfälle pro Minute
V	Volt
Ci	Curie
U	units; Einheiten
n	Anzahl
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes funktionelles System, welches in erster Linie der Abwehr schädlicher körperfremder Substanzen (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten etc.) sowie der Elimination anomaler (z. B. maligne entarteter) Körperzellen dient.

Ein fehlerfreies und geordnetes Zusammenwirken der Bestandteile des Immunsystems ist für den Organismus lebenswichtig. So kann der Ausfall einer wichtigen Komponente wie er bei primären Immundefekten (z. B. Agammaglobulinämie Typ Bruton) oder bei erworbenen Immunschwächen (z. B. AIDS) vorkommt, Krankheit und Tod zur Folge haben [1, 2]. Auf der anderen Seite wird eine fehlgerichtete unzweckmäßige Aktivierung des Immunsystems kausal für das Auftreten von Allergien und Autoimmunkrankheiten verantwortlich gemacht [3].

Obwohl bei der Mehrzahl der Krankheiten dem Immunsystem keine primäre pathogenetische Rolle zukommt, gibt es wohl kaum Erkrankungen in deren Verlauf die auftretenden Schäden und Veränderungen der Individualstruktur nicht zu einer immunologischen Mitbeteiligung führen. So bestimmt das Immunsystem oftmals maßgeblich den Verlauf einer Krankheit – entscheidet sich an ihm, ob eine Heilung (z. B. Wundheilung), Chronizität oder Fortschreiten (z. B. Malignome, Arteriosklerose [4]) der Erkrankung stattfindet.

Eine gezielte therapeutische Beeinflussung immunologischer Mechanismen im Sinne einer Pharmakotherapie bietet daher ein großes Potential zur Besserung einer Vielzahl krankhafter Zustände. So gehören heute beispielsweise Nicht-Steroidale Antiphlogistika (NSAIDs), die neuerdings zugelassenen COX-2 Inhibitoren oder Glukokortikoide zu vielverwendeten Arzneimittelgruppen. Glukokortikoide werden bereits seit den 1940er Jahren für die Behandlung eines weiten Spektrums entzündlicher Erkrankungen eingesetzt. Darunter fallen „Volkskrankheiten“ wie die Rheumatoide Arthritis und Asthma. Der beachtlichen Wirksamkeit der Glukokortikoide steht allerdings vor allem bei Langzeitanwendung ein eher ungünstiges Nebenwirkungsprofil gegenüber.

Bei der Suche nach neuen Immunpharmaka mit hoher Wirksamkeit bei geringen Nebenwirkungen ist ein eingehendes Verständnis des Immunsystems, die Charakterisierung aller seiner Bestandteile und eine Kenntnis über das Zusammenspiel dieser Elemente unerlässlich. Die vorliegende Arbeit will versuchen, hierfür einen Beitrag zu leisten.

Das Volumen des menschlichen Organismus besteht zu circa 60 % aus Körperzellen und zu 40 % aus Extrazellularraum. Sehr stark vereinfacht haben sich phylogenetisch zwei immunologische Effektorsysteme zur Verteidigung dieser beiden Kompartimente entwickelt. Die Effektorschenkel lassen sich zusätzlich in eine angeborene und adaptive Komponente einteilen. Zum Schutz des Extrazellulärraums werden erstens u. a. C-reaktives-Protein, Mannan-bindendes-Lectin und Komplement synthetisiert. Zweitens sind Granulozyten und Makrophagen fähig Mikroorganismen zu phagozytieren. Als adaptiver Teil sind B-Zellen in der

Lage spezifische Antikörper herzustellen. Das intrazelluläre Körperkompartiment kann dagegen von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten, letztere ausgerüstet mit ihren spezifischen T-Zell-Rezeptoren, kontrolliert werden.

Eine grundsätzliche Frage der Immunologie ist, wie das Immunsystem überhaupt erkennt wann es zu reagieren hat bzw. wie die Aktivierung seiner Effektorsysteme abläuft. Welche Zellen haben die Kontrolle eine Immunantwort auszulösen, d. h. welche Zellen regulieren das Immunsystem? Diese Frage ist deshalb von entscheidender Bedeutung, da ihre Antwort den Schlüssel zum Verständnis von Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstoßungen und dem Versagen des Immunsystems bei malignen Erkrankungen beinhaltet. Interessanterweise hat sich die Antwort auf die Frage, welche Zellpopulation nun das entscheidende regulative Element darstellt, in den vergangenen Jahrzehnten mehrfach gewandelt. Zuerst wurde angenommen, dass T- und B-Lymphozyten mit ihren spezifischen Antigenrezeptoren durch eine simple Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Antigenen das Immunsystem aktivieren. Später wurde die Bedeutung der T-Helfer Zellen (Th-Zellen) und des Gleichgewichts von Th1- / Th2-Zellen, der kostimulatorischen Signale durch Antigen-Präsentierende-Zellen sowie neuerdings die Existenz Regulatorischer-T-Zellen erkannt [5, 6]. Seit einiger Zeit wird auch die Rolle der angeborenen Immunerkennung und insbesondere ihr richtungsgebender Einfluss auf das adaptive Immunsystem neu definiert [7]. Das *Danger Model* der Immunologie geht sogar soweit den Nicht-Immunzellen, d. h. allen Zellen des Organismus, durch die von ihnen bei einer Schädigung freigesetzten Signale, die alleinige Kontrolle über die Aktivierung des Immunsystems zuzuschreiben [8-10]. Auch wenn diese Vorstellung vielleicht übertrieben ist, so sollte dennoch festgehalten werden, dass Immunzellen nicht alleine agieren, sondern vielmehr ihre Aufgaben im Zusammenspiel mit den Zellen des gesamten Organismus wahrnehmen. Ein Beispiel dafür ist das klassische Bild einer akuten Entzündung bei der eine Mitbeteiligung des lokalen Gefäßsystems, der Bindegewebskomponenten und der Parenchymzellen nachweisbar ist. Zur Natur einer akuten Entzündungsreaktion gehört es idealer Weise auch, dass nach Beseitigung der auslösenden Noxe eine Rückkehr zu einem immunologisch ruhigen Zustand stattfindet. Anders formuliert ist nach dem Beginn einer Immunreaktion ein richtiges Maß an Aktivierung und später eine Drosselung der aktivierten Mechanismen erforderlich. Außer Kontrolle geraten, könnte das Immunsystem zweifellos den baldigen Tod seines eigenen Organismus herbeiführen. Damit dieser Fall nicht eintritt, ist im Zuge der Immunregulation eine vielfältige Kommunikation der Immunzellen untereinander, aber auch mit den übrigen Körperzellen notwendig. Diese Kommunikation kann einmal durch direkte Zell-Zell-Kontakte erfolgen oder über einige Entfernung hinweg durch eine Vielzahl an Botenstoffen vermittelt werden. Biochemisch unterscheiden sich diese Mediatoren beträchtlich und bilden ein vielfältiges Spektrum angefangen bei kleinen unbeständigen Molekülen wie dem Stickstoffmonoxid, über biogene Amine wie dem Histamin, Lipidmediatoren wie den Prostaglandinen, bis hin zu Proteinen wie den Zytokinen.

### 1.2 Zytokine: Botenstoffe des Immunsystems

Die Liste der bekannten Proteine, die immunologische Signale meist über kurze Strecken zwischen Zellen übertragen können, wächst ständig und hat bis heute die Zahl von 150 bereits überschritten [11]. Diese sogenannten Zytokine sind zur Kommunikation und damit für das Zusammenspiel der Zellen bei Immunreaktionen und Entzündungsvorgängen unerlässlich. Als Steuerungselemente dienen sie der Aktivierung, Regulation und Lenkung. Als Parabel gesprochen, sind sie quasi die „Wörter“ des Immunsystems und durch Kombination der einzelnen Wörter entstehen Nachrichten, die über die Bedeutung des einzelnen Wortes hinausgehen, sich sogar deutlich von ihr unterscheiden können. Auch gibt es synonyme Wörter und durch den Wegfall eines Wortes geht der Sinn der Nachricht nicht unbedingt verloren. Tatsächlich zeichnet sich die Vielfalt der Zytokine durch eine relativ große Redundanz aus, die vermutlich u. a. die Störanfälligkeit des Systems herabsetzt. Wichtige Signale für die Freisetzung von Zytokinen sind dabei andere Zytokine, so dass sich der Begriff des *Cytokine Network* entwickelt hat, in dem sich Zytokine gegenseitig induzieren oder inhibieren.

Im Unterschied zu Hormonen, die nach der Bildung durch eine meist sehr spezialisierte Zellpopulation in der Regel über den Blutweg weit entfernt gelegene Zielorgane erreichen, wirken Zytokine vorwiegend nur lokal in der unmittelbaren Umgebung ihres Freisetzungsorts. Allerdings können einige Zytokine auch Effekte über große Distanzen vermitteln (siehe unten), vorausgesetzt sie werden in ausreichenden Mengen freigesetzt und verfügen über die notwendige Stabilität *in vivo*.

Eine wichtige Aufgabe von Zytokinen besteht in der Auslösung und Förderung einer Entzündung bzw. der Aktivierung der körpereigenen Abwehr. Bedeutende Vertreter aus dieser Gruppe der proinflammatorischen Zytokine sind Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) u.v.a.

Beispielsweise besitzen die beiden multifunktionellen Botenstoffe IL-1 und TNF $\alpha$  viele wichtige gemeinsame Wirkungen, welche nicht auf Immunzellen beschränkt sind [12-14]. So fördern sie die Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1 etc.) auf Endothelzellen und Leukozyten. Gleichzeitig werden ortsständige Zellen zur Freisetzung von chemotaktischen Zytokinen, d. h. Chemokinen [15] wie z. B. Interleukin-8 (IL-8) und MIP-1 $\alpha$ , angeregt. Diese beiden Prozesse erleichtern die gerichtete Migration von Leukozyten in Richtung eines in der Entstehung begriffenen Entzündungsherd. Zusätzlich werden die Immunzellen durch IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  aktiviert und zur Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Mediatoren veranlasst, wobei es zur Aktivierung wichtiger inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie dem Nukleären Faktor kappa B (NF $\kappa$ B) kommt. Interessanterweise kann IL-1 $\beta$  auch von Endothel- oder Epithelzellen freigesetzt werden und TNF $\alpha$  in einer membranständigen Form auf Leukozyten vorkommen. Neben den lokalen Wirkungen werden darüber hinaus auch systemische Effekte wie die gesteigerte Synthese von Akute Phase

Proteinen, eine Beeinflussung der Blutgerinnung und metabolische Veränderungen wie Fieber und Gewichtsverlust vermittelt.

Ein anderes – besonders für die zelluläre Immunantwort entscheidendes – Zytokin ist Interferon- $\gamma$ , welches seinerseits die Expression von mehr als 200 Genen reguliert [16, 17]. Seine Freisetzung erfolgt hauptsächlich durch NK-Zellen und T-Lymphozyten. Wichtige Merkmale von Interferon- $\gamma$  bestehen in seiner antiviralen Aktivität die zum Teil auf eine verstärkte Expression von MHC I und MHC II Molekülen sowie eine gesteigerte Antigenpräsentation zurückzuführen ist. Weiterhin ist Interferon- $\gamma$  einer der potentesten bekannten Faktoren zur Steigerung der mikrobiziden Aktivität von Makrophagen, die durch eine verstärkte Produktion von Sauerstoffradikalverbindungen und Stickstoffmonoxid bedingt ist. Außerdem erhöht Interferon- $\gamma$  ähnlich wie IL-1 $\beta$  bzw. TNF $\alpha$  die Zahl von Adhäsionsmolekülen auf Gefäßendothelien und kann Einfluss auf die Zellproliferation nehmen. Andererseits hat Interferon- $\gamma$  auch antientzündliche Eigenschaften. So kann es die Produktion von proentzündlichem IL-1 und IL-8 reduzieren und kann darüber hinaus durch Induktion von Apoptose in Leukozyten die Immunantwort modulieren [18]. Insbesondere erfüllt Interferon- $\gamma$  weitreichende Aufgaben für die Regulation des adaptiven Immunsystems und steuert die Differenzierung von T-Zellen in Richtung einer Dominanz des zellulären Effektorsystems. Zwar ist es für die Ausbildung eines Th1-Zell-Phänotyps nicht obligatorisch, stellt aber das wichtigste von dieser Zellpopulation freigesetzte Zytokin dar. Außerdem wird über Interferon- $\gamma$  das Wachstum und die Differenzierung von Th2-Zellen unterdrückt. Ferner bewirkt es antagonistisch zum Interleukin-4 (IL-4) der Th2-Zellen einen Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG2a.

Letztendlich kann man proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  vergleichen mit einem körpereigenen Feueralarm, der unmittelbar nach dem Einwirken einer Noxe ausgelöst wird. So lässt sich TNF $\alpha$  bereits 30 min nach einem solchen Ereignis im Serum von Mäusen detektieren [19]. Ungeachtet der nützlichen Eigenschaften, hat die experimentelle Injektion einer gesunden Maus mit einigen Mikrogramm dieser beiden Zytokine, deren Tod zur Folge. Dies veranschaulicht eindrucksvoll, dass im Normalfall nach Anschließen einer Entzündung Mechanismen greifen müssen, um einer übermäßigen immunologischen Aktivierung Einhalt zu gebieten. Zum einen wird diese Antagonisierung durch eine Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-13 (IL-13), Transforming Growth Factor-beta (TGF $\beta$ ), IL-4 etc. erreicht. Andererseits existieren für viele Zytokine lösliche Rezeptoren, die fähig sind ihr spezifisches Zytokin zu binden und dadurch seine Wirkung zu inhibieren. Zum Beispiel existieren lösliche Rezeptoren für IL-1, TNF $\alpha$ , Interferon- $\gamma$ , Interleukin-2 (IL-2) und IL-4. Diese löslichen Rezeptoren sind Formen der membranständigen Zellrezeptoren für das jeweilige Zytokin und können durch Spaltung mittels Metalloproteinasen aus letzteren entstehen. Durch einen solchen Vorgang reduziert sich gleichzeitig die Zahl der funktionsfähigen Zellrezeptoren, so dass die Zelle weniger sensibel für das betreffende Zytokin wird. Besonders komplex ist das antagonistische System für IL-1. Es gibt sowohl einen Zellrezeptor (IL-1RI) mit Signaltransduktionsfunktion, als auch einen membranständigen Lockvogel Rezeptor (IL-1RII), der die Bioaktivität von IL-1 inhibiert, da er zwar IL-1 bindet,

aber nicht in der Lage ist eine intrazelluläre Signaltransduktion auszulösen. Darüber hinaus gibt es lösliche Formen dieser Rezeptoren sowie den sogenannten IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1Ra). Der IL-1Ra ist ein Protein welches vornehmlich an den IL-1RI bindet, dort aber kein Signal auslöst, sondern den Rezeptor für die Wirkung von IL-1 blockiert [12].

Bemerkenswert ist auch, dass eine Reihe von Viren neutralisierende Proteine für Zytokine und Chemokine in ihr Genom integriert haben, um somit die Immunabwehr nach ihrem Bedürfnis modulieren und einer Eradikation entgehen zu können [20-22].

Umgekehrt hat sich die therapeutische Anwendung von  $\alpha$ -Interferonen als wirksame Therapie der chronischen viralen Hepatitis C Infektion etabliert. Erwähnenswert ist ferner, dass der Wirkmechanismus bewährter immunsuppressiver Pharmaka wie den Glukokortikoiden oder Cyclosporin A zu einem beträchtlichen Teil auf einer Hemmung der Expression einer Reihe von proinflammatorischen Zytokinen beruht [23]. Neuerdings konnten mit spezifischen Anti-TNF $\alpha$ -Pharmaka beeindruckende Erfolge in der Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen, namentlich bei der Rheumatoiden Arthritis und dem Morbus Crohn, erzielt werden [24]. Strukturell handelt es sich bei diesen Anti-TNF $\alpha$ -Substanzen entweder um Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper (Infliximab, Remicade™) oder um Fusionsproteine des löslichen TNF $\alpha$  Rezeptors mit dem Fc-Teil eines Antikörpers (Etanercept, Enbrel™).

Die Aussichten sind vielversprechend, dass sich in Zukunft durch die spezifische Blockade anderer Zytokine zusätzliche Therapieoptionen entwickeln werden. Trotz der heute noch hohen Kosten dieser Biopharmaka, werden sie möglicherweise zu einem Paradigmenwechsel in der Therapie entzündlicher Krankheiten beitragen können.

### 1.3 Interleukin-18 (IL-18)

Interleukin-18 (IL-18) ist ein proinflammatorisches Zytokin und ein wichtiger Regulator sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Komponenten des Immunsystems [25-30]. Mittels seiner Eigenschaft bereits in der Frühphase einer Immunreaktion in Erscheinung zu treten, fördert IL-18, im Zusammenspiel mit anderen Faktoren, das Entstehen lokaler und systemischer Entzündungen. Die zuerst entdeckte, direkte biologische Funktion von IL-18 war seine Fähigkeit die Freisetzung von Interferon- $\gamma$  zu bewirken [31-33].<sup>1</sup> Obwohl diese Fähigkeit immer noch bezüglich ihrer Wichtigkeit an vorderste Stelle gesetzt wird, sind mittlerweile zusätzliche Aufgaben von IL-18, insbesondere seine Rolle für die Regulation der T-Helfer-Zell-Antwort erkannt worden.

#### *Struktur, Freisetzung und Signaltransduktion von Interleukin-18:*

In Bezug auf Struktur und Freisetzung besteht eine enge Verwandtschaft von IL-18 zu IL-1. IL-18 wird ebenso wie IL-1 ohne Signalpeptid, sondern vielmehr in Form eines inaktiven Vorläuferproteins mit der Bezeichnung proIL-18, translatiert. Die Aktivierung bzw. Freisetzung

---

<sup>1</sup> Aufgrund dieser Eigenschaft wurde IL-18 anfangs der Name interferon- $\gamma$  inducing factor (IGIF) verliehen. Erst als die breitere biologische Bedeutung erkannt war, wurde der Terminus Interleukin-18 gewählt.

beider Zytokine erfolgt über proteolytische Spaltung der Vorläuferproteine durch Caspase-1 [34-36]. Neuerdings sind darüber hinaus Caspase-1 unabhängige Wege der Aktivierung beschrieben worden [37, 38], während durch Caspase-3 eine Inaktivierung von IL-18 und proIL-18 möglich ist [39].

Als mögliche Stimuli für eine Freisetzung von aktivem IL-18 wurden bakterielles Endotoxin, d. h. Lipopolysaccharid (LPS), das Fas/FasL-System, virale Infektionen und Histamin identifiziert [31-33, 37, 40-42].

Auch auf Ebene der Rezeptoren und der nachgeschalteten intrazellulären Signaltransduktion setzt sich die Homologie von IL-18 zu IL-1 fort. Der dimere IL-18 Rezeptor besteht aus den Untereinheiten IL-18R $\alpha$  und IL-18R $\beta$ , wobei letztere zuständig für die Signalweiterleitung ist [43-45]. Diese erfolgt nachweislich über MyD88 und IRAK, da sich Knockout-Mäuse für diese Faktoren als nicht responsiv gegenüber IL-18 (und IL-1) gezeigt haben [46-49]. Bedeutsamerweise kommt es konsekutiv über TRAF-6 zu einer Aktivierung des für Entzündungen entscheidenden Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B [49-53]. Weiterhin schaltet IL-18 über einen zweiten Signalweg p38 MAP-Kinasen ein [52-55].

### *Interleukin-18 produzierende Zellen:*

Als grundsätzliche Tatsache ist festzuhalten, dass IL-18 sowohl von Immunzellen als auch von anderen Körperzellen gebildet werden kann. Auf Seiten des Immunsystems werden Makrophagen [33, 56, 57] und andere Antigen-Präsentierende-Zellen [39, 58, 59] als die wesentlichen IL-18 Produzenten angesehen. In humanen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) gesunder Blutspender lässt sich beispielsweise einerseits die mRNA und darüber hinaus proIL-18 konstitutiv nachweisen [60]. Dies stellt einen Unterschied zu IL-1 dar, da für letzteres eine konstitutive Expression in PBMCs nicht stattfindet [61, 62]. Aus dem Lager der nicht-hämatopoetischen Zellreihen wurde die Fähigkeit der IL-18 Expression unter anderem für epitheliale Zellen wie Keratinozyten [63, 64], Enterozyten [65, 66] und das Atemwegsepithelium [67], aber auch für Osteoblasten [68], Chondrozyten [69], Synoviozyten (von Patienten mit Rheumatoider Arthritis) [70], Astrozyten [71] und Zellen der Nebennierenrinde [72, 73] gezeigt.

Zusammengenommen erscheint das Spektrum der IL-18 exprimierenden Zellen also recht heterogen. Eine Gemeinsamkeit kann man allerdings darin suchen, dass es sich durchweg um Zellen handelt, denen eine Schlüsselfunktion beim Auslösen einer Immun- / Entzündungsreaktion zugedacht werden kann. Dies ist für antigenpräsentierende Immunzellen ebenso der Fall wie für epitheliale Zellen, welche die mechanische Barriere zur Umwelt bilden und damit z. B. beim Eintreten von Mikroorganismen quasi an vorderster Front stehen. Ebenso muss es nach einer Knochenfraktur oder einem anderen Trauma zu einer, der Heilung dienlichen, Entzündung kommen.

Der Aufwand für die Zellen IL-18 konstitutiv in seiner inaktiven Vorstufe bereitzustellen, scheint gerechtfertigt, weil dadurch gegebenenfalls eine unverzügliche Freisetzung möglich ist. Insbesondere ist die Auslösung einer Immunaktivierung mittels IL-18 somit unabhängig vom Funktionieren der zellulären Proteinsynthesemaschinerie, d. h. auch eine jüngst virusinfizierte Zelle, deren Stoffwechsel bereits auf Vorgänge der Virusreplikation umgepolt wurde, könnte möglicherweise noch einen immunaktivierenden Hilferuf initiieren.



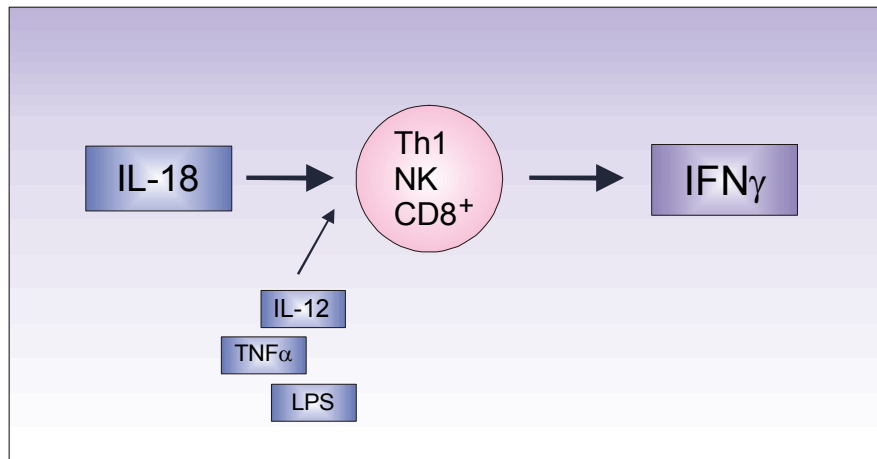


Abb. 1.1: Schema über die Interferon- $\gamma$  induzierende Funktion von Interleukin-18. Unter Anwesenheit von Kofaktoren wie IL-12,  $\text{TNF}\alpha$  oder Lipopolysaccharid bewirkt IL-18 die Produktion und Freisetzung von Interferon- $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) durch Th1-, NK- und  $\text{CD8}^+$ -Zellen.

### *Die biologischen Funktionen von Interleukin-18:*

In seiner Eigenschaft als immunstimulierender Botenstoff ist IL-18 fähig eine Wirkung bei einem breiten Spektrum von Immunzellen hervorzurufen. Vielleicht am bedeutsamsten ist die Eigenschaft von IL-18 in NK-Zellen,  $\text{CD8}^+$  zytotoxischen T-Zellen und  $\text{CD4}^+$  Th1-Zellen die Freisetzung von Interferon- $\gamma$  anzuregen (siehe Abb. 1.1) [32, 33, 74-79].

Grundsätzlich ist eine Freisetzung von Interferon- $\gamma$  durch T-Zellen abhängig von der Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors. Nichtsdestotrotz ist die Kombination der Zytokine IL-12 (welches z. B. von B-Zellen und Makrophagen produziert wird) und IL-18 in der Lage eine T-Zell-Rezeptor unabhängige Interferon- $\gamma$  Sekretion zu bewirken [74, 79-86]. Hingegen sind IL-18 und IL-12 für sich alleine nur schwache Induktoren von Interferon- $\gamma$  [27, 29]. Ein tieferer Sinn für diese Tatsache könnte darin zu suchen sein, dass die obligatorische Notwendigkeit zweier Signale einen wirksamen Sicherheitsmechanismus gegen eine versehentliche Aktivierung Interferon- $\gamma$  vermittelter Immunvorgänge darstellt. Die synergistische Wirkungspotenzierung der Kombination IL-12/IL-18 wird dabei einerseits durch das orchestrierte Einschalten additiver Transkriptionsfaktoren am Interferon- $\gamma$  Promoters erreicht [49, 51, 84, 87-91]. Andererseits induzieren IL-18 und IL-12 den jeweiligen Zellrezeptor ihres Partners [81, 83, 92-94].

Abgesehen von IL-12 können auch andere Faktoren, wie z. B. LPS, Interferon- $\alpha$ / $\beta$  oder  $\text{TNF}\alpha$  als suffiziente Kostimuli für IL-18 dienen [42, 95, 96]. Interessanterweise hängt ihr Wirkmechanismus scheinbar teilweise mit einer endogenen IL-12 Ausschüttung zusammen.

Im Übrigen kann auch das mit IL-18 verwandte IL-1 die Interferon- $\gamma$  Freisetzung stimulieren. Allerdings ist IL-1 diesbezüglich als fünf- bis zehnmals schwächer wirksam beschrieben worden [77].

Obwohl IL-18 in seiner Rolle als Interferon- $\gamma$  induzierender Faktor in der Regel ein kostimulierendes Signal benötigt, sollte seine Bedeutung nicht unterschätzt werden. Beispielsweise zeigen IL-18 $^{-/-}$  Knock-out-Mäuse nach Präkonditionierung mit *Propionibacterium acnes*

und LPS Injektion um 80 % niedrigere zirkulierende Interferon- $\gamma$  Spiegel als Wildtyp Mäuse, trotz normaler Level an IL-12 [97]. Vergleichbare Ergebnisse zeigen Caspase-1<sup>-/-</sup> Knock-out-Mäuse oder werden nach Injektion von Anti-IL-18-Antikörpern erhalten [33, 36, 98, 99].

Außer in NK-Zellen und T-Zellen ist die Kombination IL-12/IL-18 fähig auch in murinen B-Zellen eine Interferon- $\gamma$  Produktion zu veranlassen [80, 81].

Neben Interferon- $\gamma$  kann IL-18 die Produktion anderer proinflammatorischer Mediatoren hervorrufen. Hierzu zählen IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-2R $\alpha$ , IL-4, IL-13, GM-CSF, IL-8, Stickstoffmonoxid und Histamin [29, 69, 86, 100-104]. Außerdem induziert IL-18 am Entzündungsprozess beteiligte Proteine, wie z. B. das Adhäsionsmolekül ICAM-1 und die Matrix-Metalloproteinase-9 [105, 106].

Stark vereinfacht, können die humorale Abwehr (bewerkstelligt durch antikörperproduzierende B-Zellen) und die zelluläre Abwehr (bewerkstelligt durch NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen) als die beiden wesentlichen Effektorschenkel des Immunsystems aufgefasst werden. Die Regulierung dieser beiden Systeme ergibt sich nach diesem Modell aus der Balance der Th1- / Th2-Zellen. Insgesamt wird IL-18 als ein ausschlaggebendes Gewicht zugunsten einer Th1-Antwort und einer zellulären Immunantwort angesehen [27, 107, 108]. Dafür spricht die bereits erwähnte Eigenschaft von IL-18 Th1-Zellen zur Freisetzung von Interferon- $\gamma$  anzuregen, welches konsekutiv die Sekretion von IgE und IgG1 durch B-Zellen inhibieren kann [80, 109]. Darüber hinaus erhöht IL-18 direkt die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen über eine Steigerung des Perforin-Systems und FasL [33, 75, 104, 110-114].

Auf Th2-Zellen hat IL-18 dagegen keinen aktivierenden Effekt, vermutlich allein deshalb nicht, weil Th2-Zellen keinen Rezeptor für IL-18 exprimieren [49, 81, 83, 94, 107]. Nicht abschließend geklärt ist die Frage, welchen Einfluss IL-18 auf die Differenzierung von Th0-Zellen in den Th1-Phänotyp ausüben kann [27, 29]. Mit Sicherheit ist dieser Einfluss jedoch deutlich geringer im Vergleich zu IL-12 [91, 115]. Im Gegenteil ist seit kurzem bekannt, dass IL-18 bei Anwesenheit von IL-2 die Differenzierung von Th0-Zellen in Th2-Zellen begünstigt [29, 102]. Hierbei ist vermutlich die Induktion der Freisetzung von IL-4 ausschlaggebend. Zusammengekommen scheint IL-18 in Kombination mit IL-12 einen Th-1 Phänotyp, dagegen bei einem anderen Zytokinmilieu auch einen Th2-Phänotyp begünstigen zu können [29]. Das IL-18 gleichermaßen eine stimulierende Wirkung auf die humorale Immunantwort ausüben kann, wird dadurch bekräftigt, dass nach Gabe von IL-18 eine Steigerung der IgE Antwort, Eosinophilie und Freisetzung von Histamin durch Mastzellen demonstriert werden konnte [103, 116, 117].

### *Die Aufgaben von Interleukin-18 bei der Immunabwehr von Mikroorganismen:*

Ergebnisse über den protektiven Einfluss von IL-18 bei der Immunabwehr liegen bis dato vornehmlich für tierexperimentelle Infektionsmodelle mit einer Reihe von intrazellulären Mikroorganismen vor. Dies unterstreicht den Anteil von IL-18 an der zellulären Immunantwort, bewerkstelligt u. a. durch Freisetzung von Interferon- $\gamma$  bzw. eine zusätzliche zytotoxische Aktivierung von NK- und CD8<sup>+</sup>-Zellen.

Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass gegenüber *Mycobacterien* resistente Mäusestämme eine höhere Expression von IL-18, IL-12 und Interferon- $\gamma$  aufweisen als Stämme mit einer ausgeprägten Anfälligkeit für diese Erreger [118, 119]. Gleichsam manifestiert sich bei IL-

18<sup>-/-</sup> Knock-out-Mäusen ein schwereres Krankheitsbild, welches sich durch exogene IL-18 Administration vermeiden lässt [120]. In einem Modell der *Salmonella typhimurium* Infektion trat durch Anti-IL-18-Antikörper eine Verschlimmerung des Krankheitsverlaufs bei gleichzeitig niedrigerer Interferon- $\gamma$  Produktion auf [121]. Darüber hinaus ist endogenes IL-18 bei der Ausheilung einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* beteiligt [56]. Belegt ist auch, dass epitheliale Zellen bei einer Infektion mit z. B. *Chlamydia trachomatis* aktives IL-18 freisetzen [122].

Bei der vor allem im Rahmen einer AIDS-Erkrankung auftretenden opportunistischen Pilzinfektion mit *Cryptococcus neoformans* konnte tierexperimentell eine protektive Rolle von IL-18, u. a. sichtbar an einer verlängerten Überlebenszeit der infizierten Mäuse, demonstriert werden [123-128]. Die HIV Replikation selbst, kann in Kulturen von frisch infizierten PBMCs durch IL-18 gehemmt werden [129]. Ein Effekt der wahrscheinlich auf die Induktion von Interferon- $\gamma$  zurückzuführen ist. In anderen Zellkulturmodellen kann IL-18 dagegen, vermutlich über eine erhöhte Freisetzung von TNF $\alpha$  und IL-6, die HIV Typ 1 Produktion begünstigen [52, 130]. Im Tierexperiment viraler Infektionen mit dem Herpes simplex Virus oder dem Vaccinia Virus steht demgegenüber eindeutig der protektive Effekt von IL-18 im Vordergrund [131, 132].

### *Bedeutung von Interleukin-18 bei der Tumorregression:*

Infolge seines Wirkungsprofils mit Steigerung der zytotoxischen Aktivität von NK- / CD8<sup>+</sup>-Zellen könnte IL-18 einen geeigneten Ansatzpunkt für eine Anti-Tumor-Immuntherapie darstellen. Tatsächlich konnte vielfach die Anti-Tumor-Wirkung von IL-18 *in vivo* bewiesen werden: Zum Beispiel ließ sich in Mäusen durch intraperitoneale Injektion von IL-18 das Wachstum eines Sarkoms hemmen. Wurde IL-18 bereits einige Tage vor den Sarkomzellen verabreicht, überlebten sämtliche Mäuse, während sie ohne IL-18 Administration nach 3 Wochen starben. Darüber hinaus kam es zur Generierung spezifischer CD4<sup>+</sup>-Zellen, welche den überlebenden Mäusen eine Resistenz gegenüber einer zweiten Inokulation mit Sarkomzellen verliehen [133, 134].

In einer anderen Studie an Mäusen mit Gliomen führte eine einzelne Injektion von IL-18 direkt in das Geschwulst zur Tumorregression, deren Ausmaß bei gleichzeitiger Depletion der NK-Zellen reduziert war [135]. Ebenfalls hauptsächlich durch NK-Zellen vermittelt, konnte eine Vorbehandlung mit exogenem IL-18 die Tumormanifestation nach Inokulation mit Melanomzellen verhindern [136]. Im Gegensatz dazu wurde allerdings auch berichtet, dass IL-18 speziell im Melanommodell tumorigene Eigenschaften besitzt [137, 138].

Ein anderer experimenteller Ansatz den Anti-Tumor-Effekt von IL-18 offenzulegen, besteht in einem IL-18-Gentransfer in Tumorzellen und anschließender Inokulation in Versuchstiere. Solche durch Transfektion zur Expression von IL-18 veranlassten Tumorzellen, wiesen einen Verlust der Tumorigenität bzw. im Falle einer Manifestation ein verlangsamtes Wachstum auf [139, 140]. Werden Vektoren mit dem Gen für IL-18 direkt in einen etablierten Tumor eingebracht, kann es ebenfalls zu einer vollständigen Regression kommen [141, 142].

Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist, dass für das humane Kolonkarzinom eine Einschränkung der Bildung von IL-18 beschrieben und mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf in Zusammenhang gebracht worden ist [66].

In mehreren Studien hat sich die Kombination von IL-12/IL-18 als besonders wirksam bezüglich ihres Anti-Tumor-Effekts erwiesen [139, 141-145]. Allerdings muss angemerkt werden,

dass diese Kombination auch mit toxischen Nebenwirkungen verbunden ist [146, 147]. Festzuhalten ist außerdem, dass IL-18 *in vitro* keine direkte zytostatische Wirkung auf die Tumorzellproliferation besitzt [133]. Neben einer NK- / T-Zell Aktivierung und Interferon- $\gamma$  Produktion gewinnt IL-18 vielmehr wahrscheinlich zusätzliche tumorsuppressive Eigenschaften durch eine Inhibition der Angiogenese und konsekutive Hypovaskularisation des Tumors [139, 148].

### *Pathologische Implikationen von Interleukin-18:*

Ogleich IL-18 einen wichtigen Beitrag für die Immunabwehr zu leisten vermag, kann ein unkontrolliertes Übermaß eines solch potenten proinflammatorischen Zytokins durchaus einen schädlichen Einfluss auf den Organismus entfalten. Nicht verwunderlich ist deshalb, dass für IL-18 eine pathologische Rolle bei einer Reihe entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen angenommen wird. Im Umkehrschluss ergibt sich aus dieser Annahme, dass sich eine Blockierung von IL-18 im Rahmen einer pharmakologischen Immuntherapie als sinnvoll für die Behandlung solcher Erkrankungen erweisen könnte. Beispiele solcher Erkrankungen sind:

### *Rheumatoide Arthritis:*

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine häufig auftretende, entzündliche Autoimmunerkrankung primär mit Befall der Gelenke. Eine Therapie mit TNF $\alpha$  blockierenden Substanzen hat sich in jüngster Zeit als sehr wirksam erwiesen [24]. Außer für TNF $\alpha$  wurde auch für IL-18 eine erhöhte Produktion durch das Synovialgewebe von Patienten mit RA nachgewiesen [149].

Ein anerkanntes Tiermodell für die RA des Menschen ist die Kollagen-induzierte-Arthritis bei Mäusen. Durch Administration von IL-18 lässt sich in diesem Modell die Auslösung der Arthritis erleichtern bzw. der Krankheitsverlauf verschlimmern, ein Effekt der in der Kombination mit IL-12 noch verstärkt wird [149, 150]. Außerdem förderte die Verabreichung von IL-18 die Produktion von IgG1 und IgG2 Antikörpern gegen Kollagen und erhöhte andere proinflammatorische Zytokine wie Interferon- $\gamma$ , IL-6 und besonders wichtig auch TNF $\alpha$  [150]. Als Bestätigung zu diesen Ergebnissen lassen sich bei IL-18<sup>-/-</sup> Knock-out-Mäusen genau umgekehrte Verhältnisse demonstrieren: Im Vergleich zu Wildtyp Mäusen zeigten diese Tiere eine reduzierte Inzidenz der Kollagen-induzierten-Arthritis und der Krankheitsverlauf war abgemildert. Dies drückte sich u. a. in einem niedrigeren Index für Entzündungszeichen (Rötung, Schwellung, Funktionsverlust) der Extremitäten aus. Darüber hinaus waren in Gegenüberstellung zu Wildtyp Mäusen mit Arthritis die Anti-Kollagen Antikörper sowie TNF $\alpha$ , IL-6 und Interferon- $\gamma$  signifikant verringert [151].

Interessanterweise konnte bei Patienten unter Anti-TNF $\alpha$ -Therapie ein Absinken der IL-18 Spiegel gemessen werden [152], so dass sich IL-18 und TNF $\alpha$  hier offenbar gegenseitig hochregulieren können.

Das therapeutische Potential IL-18 neutralisierender Strategien konnte bereits an Mäusen mit manifester Kollagen-induzierter-Arthritis unter Beweis gestellt werden. So war ein Anti-IL-18-Antikörper in der Lage, die Schwere und das Fortschreiten des Krankheitsverlaufs zu mildern sowie die histologisch sichtbaren Knorpelerosionen zu reduzieren [153]. In Zukunft könnten daher IL-18 blockierende Substanzen eine Bereicherung in die Therapie der RA mit *Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs* darstellen.

### *Morbus Crohn:*

Gleichsam wie für die RA hat sich eine Anti-TNF $\alpha$ -Therapie als effektiv in der Behandlung des Morbus Crohn erwiesen. Bei dieser chronisch entzündlichen Darmerkrankung wird allgemein von einem Ungleichgewicht zugunsten einer Th1-Zell Antwort mit entsprechendem Zytokinmuster ausgegangen. Tatsächlich findet in den Läsionen von M. Crohn Patienten eine erhöhte Expression und Freisetzung von aktivem IL-18 statt [154, 155]. Darüber hinaus ließ sich bei vorher gesunden Mäusen durch eine tägliche intraperitoneale Injektion von IL-18/IL-12 u. a. eine intestinale Schleimhautentzündung mit blutiger Diarrhoe und Gewichtsverlust auslösen [146, 147]. Diese Krankheitserscheinungen traten gleichermaßen bei TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Knock-out-Mäusen auf und waren demnach TNF $\alpha$  unabhängig [147].

Vielversprechend ist, dass bei Mäusen die chemisch ausgelöste TNBS-Kolitis – ein Korrelat des M. Crohn – durch Administration eines Anti-IL-18-Antikörpers dramatisch abgeschwächt werden konnte. Bei IL-18<sup>-/-</sup> Knock-out-Mäusen gelang es währenddessen nicht nach dem gleichen Protokoll eine Kolitis auszulösen [156]. Darüber hinaus war es möglich die T-Zell abhängige experimentelle Kolitis in SCID-Mäusen, welche ein anderes Mausmodell des M. Crohn darstellt, durch die Expression von Antisense mRNA gegen IL-18 deutlich zu unterdrücken [157].

### *Multiple Sklerose:*

Ebenso könnte IL-18 an der Pathogenese der Multiplen Sklerose beteiligt sein. Beginn und Verlauf der experimentellen Multiplen Sklerose bei Ratten war mit hohen mRNA Spiegeln von IL-18 im ZNS verbunden [158]. Bei Gabe neutralisierender Anti-IL-18-Antikörper konnte die Entwicklung einer Multiplen Sklerose signifikant verhindert werden, vermutlich durch Verschiebung des Th1- / Th2-Zell Gleichgewichts. Gleichsam weisen IL-18<sup>-/-</sup> Knock-out-Mäuse eine Resistenz bezüglich der Entstehung einer autoimmunen Enzephalomyelitis auf [159]. Über das Tierexperiment hinaus konnte auch bei Patienten mit Multipler Sklerose eine IL-18 Expression in den Krankheitsherden und eine Erhöhung im Blutserum detektiert werden [160, 161]. Interessanterweise zeigten PBMCs von Patienten mit Multipler Sklerose eine erhöhte mRNA für Caspase-1 im Vergleich zu gesunden Probanden [162]. Kongruent dazu zeigen Caspase-1<sup>-/-</sup> Knock-out-Mäuse eine geringere Anfälligkeit und einen abgemilderten Krankheitsverlauf der experimentellen Multiplen Sklerose [163].

### *Sepsis:*

Die Rolle von IL-18 in der Pathogenese der Sepsis stellt sich weniger eindeutig dar. Wie auch für andere proinflammatorische Zytokine scheinen sowohl protektive als auch schädliche Einflüsse möglich zu sein. Ohne Zweifel kommt es jedoch im Rahmen einer Sepsis zu einer Freisetzung von IL-18 und einem Anstieg im Serum der Patienten [164-166]. Darüber hinaus konnte im Tierexperiment bei Vorbehandlung mit neutralisierenden Anti-IL-18-Antikörpern eine erhöhte Überlebensrate nach Injektion einer letalen Dosis von Endotoxin beobachtet werden [167]. Demgegenüber kam es jedoch zu keiner signifikanten Senkung der Letalität, wenn bei Mäusen eine Sepsis durch Punktion des Zäkums ausgelöst wurde und die Blockade von IL-18 innerhalb 8 Stunden nach diesem Ereignis durchgeführt wurde [168]. Damit nicht genug, bewirkte in dieser Studie die Neutralisation von IL-18 sogar eine signifikante Steigerung der Sterblichkeit, wenn gezielt die Mäuse betrachtet wurden, die 6 Stunden nach der Punktion

des Zäkums relativ niedrige IL-6 Werte im Serum besaßen. Dieses Ergebnis weist in der Tat darauf hin, dass der Einfluss von IL-18 auf den Verlauf der Sepsis von anderen Faktoren, wie z. B. dem aktuellen Status der Entzündung und der Immunaktivierung, abhängig ist.

### *Hepatische Erkrankungen:*

Bereits bei seiner Entdeckung wurde IL-18 als ein Faktor beschrieben, der maßgeblich für die akute Leberschädigung bei Mäusen nach sequentieller Gabe von *P. acnes* und LPS verantwortlich ist [33]. Die leberschädigende Wirkung von IL-18 scheint maßgeblich durch seine Verbindung zum Fas/FasL-System, aber auch über TNF $\alpha$  vermittelt zu sein [37, 169]. Bei Patienten mit chronischer Hepatitis C wurden lokal vermehrtes Interferon- $\gamma$  und IL-18 nachgewiesen [170].

### *Insulin-abhängiger-Diabetes-mellitus, Asthma, Psoriasis, etc.:*

Da Zytokine wie Interferon- $\gamma$  und TNF $\alpha$  an der Entstehung eines Insulin-abhängigen-Diabetes-mellitus (IDDM) mitbeteiligt sind [171-174], wurde auch für IL-18 eine derartige Eigenschaft postuliert. Die bisherigen Studien an NOD-Mäusen weisen allerdings in verschiedene Richtungen [175, 176], so dass bis dato die Rolle von IL-18 unklar bleibt [27, 29].

Entsprechend den Berichten, dass IL-18 auch auf die Th2-Antwort fördernd wirken kann [102], liegen konträre Ergebnisse über seinen Einfluss bei allergischen Erkrankungen mit einem Th2-Übergewicht vor [177-181]. So wurde für das allergische Asthma spekuliert, dass die letztendlichen Wirkungen von anderen Faktoren sowie außerdem der Applikationsroute von IL-18 abhängig sind [29].

Die Liste von Erkrankungen bei denen eine Verwicklung von IL-18 relevant scheint, lässt sich noch lange weiter fortführen. Unter anderem liegen wissenschaftliche Arbeiten bezüglich der Psoriasis [182-184], der Graft-versus-Host-Disease [185-187], des Lupus erythematoses [188] und bei Glomerulonephritis [188-190] vor.

## 1.4 Interleukin-18-Bindungsprotein (IL-18BP)

Wie bereits erwähnt, gibt es für eine Reihe von Zytokinen spezifische endogene Proteine – oftmals in Form eines löslichen Rezeptors –, welche an das betreffende Zytokin binden und es dadurch inaktivieren können. Die Frage lag also nahe, ob ein derartiges neutralisierendes Protein auch für IL-18 existiert.

### *Wie wurde IL-18BP entdeckt?*

Vor kurzem gelang nun tatsächlich die Entdeckung eines solchen humanen Interleukin-18-Bindungsproteins (IL-18BP) [191]: Mit Hilfe der Liganden-Affinitäts-Chromatographie isolierten Novick *et al.* ein Protein aus menschlichem Urin gesunder Probanden mit der Fähigkeit IL-18 zu binden und zu neutralisieren. Nach einer Teilsequenzierung des isolierten Proteins konnte die komplette zugehörige Gensequenz unter Zuhilfenahme humaner cDNA-Datenbanken ermittelt werden, so dass eine anschließende Klonierung, Expressierung und Charakterisierung des IL-18BP möglich waren.

Einen ähnlichen Arbeitsansatz verfolgten Aizawa *et al.*, wobei hier zunächst ein murines IL-18BP (mIL-18BP) aus dem Serum von Mäusen mit Endotoxin-Schock isoliert wurde [192].

### *Was ist die Funktion von IL-18BP?*

Die biologische Funktion von IL-18BP konnte anhand verschiedener Bioassays beleuchtet werden [191-194]. Das Prinzip solcher Bioassays besteht darin, dass Zellkulturen von z. B. murinen Splenozyten, humanen KG-1 Zellen oder PBMCs auf eine Stimulation durch IL-18 (u. U. plus Kostimulus) mit der Freisetzung von Interferon- $\gamma$  antworten. Dieser Versuchsaufbau wurde nun abgeändert, indem IL-18 direkt vorher mit verschiedenen Dosierungen von IL-18BP vorinkubiert wurde. Dosisabhängig trat daraufhin eine verminderte Freisetzung von Interferon- $\gamma$  in den Zellkulturen auf. Als Ergebnis mehrerer Arbeitsgruppen ließ sich wiederholt beobachten, dass bei äquimolaren Konzentrationen von IL-18 und IL-18BP eine Verminderung von Interferon- $\gamma$  um mehr als 50 % zu messen ist. Bei einem größeren molaren Überschuss von IL-18BP kam es konsistent zu einem nahezu vollständigem Erliegen der Interferon- $\gamma$  Freisetzung.

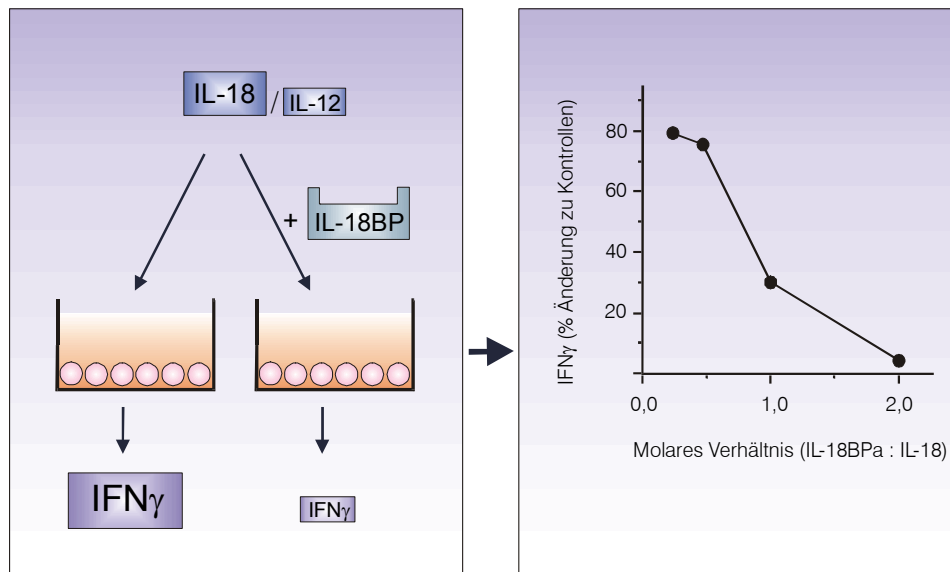
Eine eingehende Untersuchung in Bezug auf die Titration der IL-18BP Aktivität wurde von Kim *et al.* anhand eines Bioassays mit NKO Zellen durchgeführt [193]. In diesen Experimenten reichte bereits ein 2facher molarer Überschuss der Isoform a von IL-18BP (IL-18BP<sub>a</sub>; siehe unten), um eine komplette Inhibition der IL-18 Aktivität, betreffend der Interferon- $\gamma$  Produktion, zu erzielen (Abb. 1.2A).

Weiterhin liegen Daten vor die belegen, dass IL-18BP auch andere IL-18 vermittelte Prozesse, wie z. B. die Freisetzung von IL-8 aus PBMCs oder die Aktivierung von NF $\kappa$ B, hemmen kann [191].

Zusammengefasst ist demonstriert worden, dass IL-18BP einen in niedrigen Konzentrationen hochwirksamen Inhibitor IL-18 vermittelter Zellfunktionen darstellt, welcher eine vollständige Hemmung der IL-18 induzierten Interferon- $\gamma$  Freisetzung herbeiführen kann. Demgegenüber war es in Kontrollexperimenten nicht möglich mit IL-18BP die IL-18 unabhängige Interferon- $\gamma$  Freisetzung, wie sie z. B. bei Stimulation mit Concanavalin A auftritt, zu hemmen [191]. Demnach muss IL-18BP als spezifischer Inhibitor von IL-18 und nicht als unspezifischer Hemmstoff der Interferon- $\gamma$  Expression angesehen werden. Die zielgerichtete Spezifität von IL-18BP für IL-18 konnte indes dadurch belegt werden, dass IL-18BP nicht in der Lage ist die Aktivität von IL-1 $\beta$ , welches strukturell mit IL-18 verwandt ist, zu beeinflussen [191, 194]. Jedoch ist humanes IL-18BP in der Lage sowohl humanes IL-18 als auch das murine IL-18 gleichermaßen zu neutralisieren [191, 194], wobei es unerheblich ist, ob es sich um rekombinant hergestelltes oder endogenes IL-18 handelt [191]. Andererseits ist IL-18BP nicht in der Lage proIL-18 zu binden [193].

Die anhand der beschriebenen Zellkultur-Bioassays gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion von IL-18BP konnten tierexperimentell bestätigt werden [191]. Bekanntermaßen reagieren Mäuse nach LPS Injektion innerhalb von Stunden mit der Freisetzung von endogenem IL-18 und der konsekutiven Genexpression von Interferon- $\gamma$ . Novick *et al.* injizierten Mäusen deshalb LPS oder LPS plus IL-18BP. IL-18BP war dabei in der Lage den LPS induzierten zirkulierenden Interferon- $\gamma$  Spiegel um > 90 % zu senken (siehe Abb. 1.2B). Gleichzeitig war

A



B

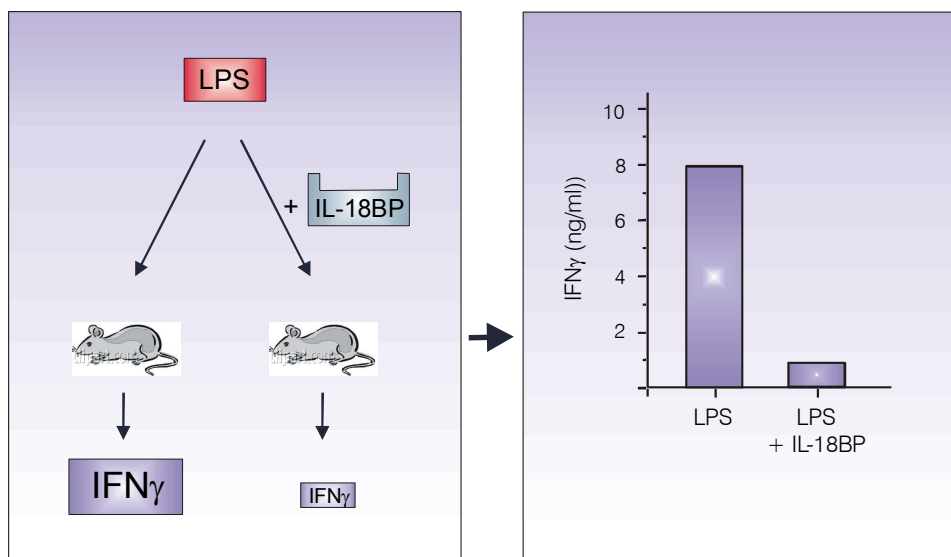


Abb. 1.2: Schema über die biologische Funktion von Interleukin-18-Bindungsprotein.  
 (A) In Bioassays mit z. B. NKO Zellen inhibiert die Präinkubation mit IL-18BP wirkungsvoll die IL-18 induzierte Freisetzung von Interferon- $\gamma$ . Auf der rechten Seite ist die prozentuale Hemmung der Interferon- $\gamma$  Freisetzung im Vergleich zu den Kontrollen ohne IL-18BP gegen ein ansteigendes molares Verhältnis von IL-18BP : IL-18 aufgetragen. Darstellung nach Kim *et al.*, PNAS, 2000.  
 (B) LPS führt *in vivo* nach Injektion in Mäuse zur Freisetzung von IL-18 und konsekutiv zum Anstieg von Interferon- $\gamma$ . Die gleichzeitige Gabe von IL-18BP zu LPS hemmt die Induktion von Interferon- $\gamma$ . Rechts sind die Interferon- $\gamma$  Serumspiegel 6 h nach Injektion abgebildet. Wiedergegeben nach Novick *et al.*, Immunity, 1999.



eine drastische Verminderung der mRNA für Interferon- $\gamma$  in den Splenozyten der Mäuse zu beobachten.

### *Wie ist der Wirkmechanismus von IL-18BP?*

Es ist als gesichert anzusehen, dass die Wirkung von IL-18BP – wie bereits terminologisch impliziert – durch direkte Bindung an IL-18 ausgeübt wird. Dafür spricht einmal die bei der Isolation aus Urin angewendete Liganden-Affinitäts-Chromatographie, bei der IL-18 gekoppelte Chromatographiesäulen Verwendung fanden. In sogenannten „Crosslinking“ Experimenten mit radioaktiv markiertem IL-18 ( $^{125}\text{I}$ -IL-18) konnte zusätzlich bestätigt werden, dass eine Bindung an IL-18BP erfolgt, und dass dabei 1 : 1 Komplexe beider Proteine vorliegen [191, 192]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass IL-18BP die Bindung von IL-18 an den IL-18 Rezeptor (IL-18R) auf der Zelloberfläche verhindert [192].

### *Welche Isoformen von IL-18BP gibt es?*

Durch Analyse mehrerer humaner cDNA-Bibliotheken konnten bislang 4 Isoformen für IL-18BP identifiziert werden [191, 193]. Von diesen verschiedenen Splicing-Varianten war die Isoform a (IL-18BP<sub>a</sub>) mit Abstand am häufigsten vorhanden. Für eine herausragende Bedeutung von IL-18BP<sub>a</sub> gegenüber den anderen Isoformen spricht zusätzlich, dass IL-18BP<sub>a</sub> mit die höchste Effektivität bezüglich der Neutralisation von IL-18 besitzt. In Affinitätsstudien wies IL-18BP<sub>a</sub> eine 10fach höhere Affinität zu IL-18 als die Isoform c (IL-18BP<sub>c</sub>) auf und besaß eine mittlere Dissoziationskonstante von  $399\text{pM} \pm 34\text{pM}$  [193]. Nichtsdestotrotz ist auch IL-18BP<sub>c</sub> in der Lage, in Bioassays die Aktivität von IL-18 gleichermaßen wirksam zu neutralisieren. Hingegen sind die Isoform b und Isoform d dazu nicht fähig, weshalb ihre biologische Relevanz bislang im Dunkeln liegt.

### *Wie sind die strukturellen Eigenschaften von IL-18BP?*

IL-18BP ist ein lösliches Protein das zuerst mit einem Signalpeptid aus 28 Aminosäureresten translatiert wird und im Fall von IL-18BP<sub>a</sub> in seiner reifen Form aus 164 Aminosäureresten besteht. Mehrere Aminosäurereste stellen vermeintliche potentielle N-Glykosylierungsstellen dar. Das sezernierte IL-18BP<sub>a</sub> hat ein Molekulargewicht von circa 40 – 50 kDa und Experimente mit N-Glykanase lassen darauf schließen, dass in der Tat eine hochgradige Glykosylierung vorliegt [191].

Per se konnten Vergleiche der Primärstruktur von IL-18BP mit denen von anderen humanen Zytokinen, Zytokinrezeptoren oder Proteinen keine offenkundigen Homologien aufzeigen. Lediglich eine begrenzte Verwandtschaft zu einer Domäne des löslichen IL-1 Rezeptors Typ II kann festgestellt werden. Insbesondere weist IL-18BP keine Homologie zu dem Rezeptor für IL-18 auf und besitzt auch keine Transmembrandomäne [191]. Während die letztgenannte Tatsache bekräftigt, dass es sich bei IL-18BP ausschließlich um ein von Zellen sezerniertes Protein handelt, stellt das Fehlen einer strukturellen Ähnlichkeit zum IL-18 Rezeptor eine biologische Ausnahme dar.<sup>2</sup> In der Regel sind nämlich spezifische endogene Zytokin-inhibitoren, die ihre Wirkung über direkte Bindung an das Zytokin entfalten, nichts anderes als lösliche Varianten des zugehörigen membranständigen Zytokinrezeptors.

---

<sup>2</sup> Allerdings ist IL-18BP nicht die einzige Ausnahme. Es gibt auch andere rezeptorähnliche Proteine, die nur als lösliche Form vorkommen, z. B. Osteoprotegerin, Cytokin-Like-Factor-1.

### *Wie ist die genomische Organisation und Lokalisation von IL-18BP?*

Die verschiedenen IL-18BP Isoformen entstehen durch alternatives Splicing sowohl durch Exonausschluss als auch durch Splicing innerhalb der Exons und variieren in ihrer Größe und C-terminalen Sequenz [191].

Das Gen für IL-18BP liegt beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 11 in der Region 13 (= 11q13). Bemerkenswerterweise befindet sich das Gen für IL-18 ebenfalls auf dem langen Arm von Chromosom 11 (11q22), so dass eine gekoppelte Vererbung der beiden interagierenden Proteine stattfindet, was aus evolutionärer Sicht einen Vorteil darstellen dürfte.

### *In welchen menschlichen Organen wird IL-18BP exprimiert?*

Die mRNA für IL-18BP konnte konstitutiv besonders in der Milz nachgewiesen werden. Auch in Herz, Lunge, Darm, Plazenta, Prostata u. a. sowie in Leukozyten findet eine basale Transkription statt. Es lässt sich dabei in allen Organen hauptsächlich mRNA für die Isoform a von IL-18BP detektieren und nur in viel geringerer Quantität mRNA der Isoform c. [191, 192]

### *Gibt es noch weitere IL-18-Bindungsproteine?*

Neben dem IL-18BP des Menschen (Maus etc.) existiert noch eine ganze Gruppe viral codierter Proteine mit der Fähigkeit humanes IL-18 zu inhibieren [194-198]. Sämtliche dieser Viren stellen Vertreter aus der Familie der Pockenviren dar.

So ist beispielsweise seit kurzem für das *Molluscum contagiosum Virus* bekannt, dass mehrere seiner Proteine circa 20 – 30 % identisch zum humanen IL-18BP bezüglich ihrer Aminosäuresequenz sind. Trotz dieser eher begrenzten Homologie sind diese Proteine in Bioassays ähnlich effektiv wirksam wie humanes IL-18BP [194]. Das humanpathogene *Molluscum contagiosum Virus* ist der Erreger der Dellwarzen, einer meist bei Kindern und jungen Erwachsenen auftretenden Hauterkrankung [199]. Die gutartigen kleinen hautfarbenen Papeln der Erkrankung imponieren durch das scheinbar vollständige Fehlen einer Entzündungsreaktion. Obwohl bei immunkompetenten Individuen innerhalb von Monaten meist selbstlimitierend, kommt es oft zu Rezidiven und bei Patienten mit Immunschwächekrankheiten wie AIDS zu ausgeprägten Verlaufsformen [200].

An Mäusen konnte für das *Ectromelia Virus* (Erreger der Mäusepocken) demonstriert werden, dass bei einer Infektion mit einer Deletionsmutante für dessen virales IL-18BP die NK-Zellen am Infektionsort eine erhöhte zytotoxische Aktivität und eine 20fach gesteigerte Interferon- $\gamma$  Produktion im Vergleich zum Wildtyp Virus aufweisen [195].

In einem anderen Mausmodell, nämlich der intranasalen Infektion mit dem *Vaccinia Virus*, zeigte die Deletionsmutante für das betreffende virale IL-18BP eine herabgesetzte Virulenz, die sich u. a. durch einen geringeren Gewichtsverlust sowie eine niedrigere Mortalität darstellte [198].

Bis zu seiner im Jahr 1977 verkündeten Ausrottung waren die durch das *Variola Virus* hervorgerufenen Pocken (Blattern, „smallpox“, Menschenpocken) eine der am meisten gefürchtetsten Krankheiten überhaupt. Für ein Gen des *Variola Virus* kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass es ebenfalls für ein IL-18-Bindungsprotein codiert und somit gleichermaßen einen Virulenzfaktor dieses Erregers darstellt [197].

### *Welche Bedeutung darf IL-18BP zugerechnet werden?*

IL-18BP ist ein lösliches Protein ohne membranständiges Pendant und ein neues Mitglied in der Gruppe endogener Zytokinantagonisten. Es ist in der Lage IL-18 spezifisch und effektiv zu binden und dadurch seine biologische Aktivität vollständig zu blockieren. Eine mindestens 50%ige Inhibition erfolgt bereits bei einem äquimolaren Verhältnis von IL-18/IL-18BP. Dies ist ein ungewöhnlich niedriges molares Verhältnis, wenn man die Tatsache berücksichtigt, dass andere lösliche Zytokinrezeptoren wie die IL-1 Rezeptoren Typ I und Typ II oder die TNF $\alpha$  Rezeptoren p55 und p75 wenigstens in einem 5fachen molaren Überschuss vorliegen müssen, um eine vergleichbare Hemmung der biologischen Aktivität ihres jeweiligen Zytokins zu bewirken [201, 202]. Tatsächlich ist die Affinität zwischen IL-18 und IL-18BP äquivalent mit derjenigen des trimeren Hoch-Affinitäts-Komplexes aus IL-18 und seinen beiden Rezeptor-untereinheiten IL-18R $\alpha$  und IL-18R $\beta$  [81, 193, 194, 203].

Die hohe Affinität von IL-18BP zu seinem Zielprotein geht mit der Eigenschaft einer uneingeschränkten Hemmung einher. Während nämlich manche lösliche Zytokinrezeptoren (z. B. für IL-4 und TNF $\alpha$ ) in niedrigen Konzentrationen eine Stabilisierung und Wirkungsverstärkung ihres Zytokins herbeiführen können [204, 205], ist für IL-18BP ein solcher Effekt nicht erkennbar.

Die dramatische Abschwächung (> 90 %) der Interferon- $\gamma$  Produktion in Mäusen nach LPS und gleichzeitiger IL-18BP Injektion [191], ist vergleichbar mit Beobachtungen an IL-18-Knock-out-Mäusen nach LPS Injektion [97].

IL-18 ist als proinflammatorisches Signal in der Frühphase der Immunreaktion maßgeblich an der Ausprägung einer Th1-Zell Antwort mit ihrem spezifischen Zytokinprofil und der Aktivierung zytotoxischer NK- und T-Zellen beteiligt. Im Zuge der Entdeckung von IL-18BP ist jedoch klar geworden, dass die von IL-18 entfaltbare Wirkung nicht von seiner absoluten Konzentration abhängt, sondern sich vielmehr aus der Nettobilanz des Gleichgewichts beider Gegenspieler ergibt. Im gesunden Organismus sorgt konstitutiv zirkulierendes IL-18BP dabei möglicherweise für eine Abpufferung basal auftretender IL-18 Spiegel und könnte somit eine Bremswirkung für das Entstehen entzündlicher Prozesse besitzen.

Die Signifikanz der antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Fähigkeiten von IL-18BP wird durch die Existenz homologer viraler IL-18-Bindungsproteine unterstrichen, welche für die betreffenden Viren einen Teil der Behauptungsstrategie gegenüber der Immunabwehr ihres Wirtes darstellen.

Wie im vorangehenden Abschnitt aufgezeigt, konnte für IL-18 nachgewiesen werden, dass sein Vorhandensein bzw. Übergewicht bei der Entstehung und dem Verlauf verschiedener Krankheiten des Menschen verwickelt ist. Namentlich sind dies die Rheumatoide Arthritis, der Morbus Crohn, die Multiple Sklerose, die Psoriasis u. a. m.

IL-18BP ist als ein neuer Modulator der Th1-Zell Antwort in seiner Potenz gleichzusetzen mit therapeutisch applizierbaren neutralisierenden Anti-IL-18-Antikörpern. Im Vergleich zu solchen murinen und chimären Antikörpern bietet IL-18BP als körpereigenes Protein jedoch möglicherweise den Vorteil weniger immunogen zu sein. Mit anderen Worten könnte im Verlauf einer langandauernden Therapie ein geringeres Risiko bestehen, die Bildung körpereigener Antikörper zu provozieren. Nicht zuletzt deshalb befindet sich IL-18BP in der Liste möglicher Kandidaten für die Anwendung als Immunpharmakon bei den oben genannten Krankheiten.

Um einen breiten therapeutischen Einsatz rechtfertigen zu können, sind allerdings u. a. ausreichende grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse über die Verstrickung von IL-18BP im Netzwerk des Immunsystems wünschenswert.

### 1.5 Aufgabenstellung

Der Beginn der experimentellen Arbeit für die vorliegende Dissertation datiert sich auf nur wenige Monate nach der erstmaligen Beschreibung von IL-18BP. Zu diesem Zeitpunkt gab es lediglich zwei wissenschaftliche Veröffentlichungen über humanes IL-18BP [191, 192]. Darin wurde IL-18BP als ein in verschiedenen menschlichen Geweben konstitutiv exprimiertes Protein beschrieben, aber keinerlei Aussagen über eine mögliche Regulation durch andere Faktoren bzw. Immunbotenstoffe getroffen. In Anbetracht der mannigfaltigen Interaktionen und Regulationen anderer bekannter Proteine mit immunologischen Aufgaben schien es jedoch als wahrscheinlich, dass auch die Expression von IL-18BP komplexen Regulationsvorgängen unterliegen könnte. Die Aufklärung dieser Vermutung kann als die wesentliche Intention dieser Promotionsarbeit angesehen werden.

Der Schwerpunkt der Studien sollte dabei auf die Fähigkeit von ortsständigen Nicht-Immunzellen zur IL-18BP Expression gelegt werden. Wie bereits eingangs erwähnt, können prinzipiell alle Körperzellen in komplexer Art und Weise in den Ablauf von Entzündungen und die Funktionen von Immunzellen eingreifen, so dass ihnen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf entzündlicher Erkrankungen zukommen kann. Als exemplarisches Zellkulturmodell für Nicht-Immunzellen wurde vorrangig die epitheliale Kolonkarzinom Zelllinie DLD-1 ausgewählt. Insbesondere sind Kolonkarzinomzellen wie die Linie DLD-1 wichtige *In-vitro*-Modelle zur Untersuchung zellulärer Prozesse bezüglich der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie der Kolonkarzinogenese. Als Zelltypen von nicht-epithelalem Ursprung sollte zusätzlich zum einen mit primären humanen Mesangiumzellen gearbeitet werden, welche beispielsweise bei Glomerulonephritiden von Bedeutung sind. Zum anderen wurden Experimente mit primären humanen Fibroblasten durchgeführt.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei IL-18BP um ein sehr neues Forschungsobjekt handelt, standen zu Beginn der experimentellen Arbeit keine routinemäßigen Methoden für seinen Nachweis zur Verfügung. Um Aussagen bezüglich der Regulation der Genexpression von IL-18BP treffen zu können, wurde deshalb zuerst einmal eine RT-PCR für die Detektion der mRNA von IL-18BP etabliert. Da es insbesondere keine kommerziell erhältlichen Antikörper für die unmittelbare Detektion von IL-18BP gab, wurde im weiteren Verlauf bei einer externen Biotechnologie Firma die Herstellung von spezifischen Antisera in Auftrag gegeben. Mit diesen Antisera konnte dann im letzten Teil der Arbeit ein Western Blot für IL-18BP etabliert werden.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. In welchen Zelltypen wird IL-18BP konstitutiv exprimiert?

Bislang lagen nur Ergebnisse über die Expression der mRNA von IL-18BP anhand von Organextrakten vor [191, 192]. Deshalb sollte zuerst eine kleine Auswahl von einzelnen Zelltypen auf eine konstitutive IL-18BP Expression untersucht werden.

2. Erfolgt eine Regulation der Genexpression von IL-18BP?

a) auf mRNA-Ebene?

b) und auf Protein-Ebene?

3. Findet eine Regulation der Genexpression von IL-18BP auch in indirekten Kokulturen von PBMCs und ortsständigen Zellen statt?

Anstelle eines rekombinanten Immunbotenstoffs sollten ortsständige Nicht-Immunzellen mit spezifisch aktivierten PBMCs zusammengebracht werden. Man kann davon ausgehen, dass ein solcher experimenteller Aufbau ein Stück weit näher die realen Verhältnissen am Entzündungsort simuliert, da hier den PBMCs die Möglichkeit gegeben ist gleichzeitig verschiedene endogene Botenstoffe freizusetzen.

4. Bestehen Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Genregulation von IL-18 im Vergleich zu IL-18BP?

Da IL-18 und IL-18BP Gegenspieler im Entzündungsgeschehen sind, ist letztendlich ihr Konzentrationsverhältnis zueinander maßgeblich. Daher ist von Interesse, ob die Genexpression von IL-18 durch dieselben Stimuli wie für IL-18BP in gleicher oder aber entgegengesetzter Weise beeinflusst wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkulturen

#### 2.1.1 Humane DLD-1 Kolonkarzinomzellen

Die menschliche Kolonkarzinom-Zelllinie DLD-1 (siehe Abb. 2.1) wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. H. Kleinert (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) [206].

Die Zellen wurden kultiviert in 250-ml-Gewebekulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> (Inkubator, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) und mit 10 ml Nährmedium pro Flasche. Das Nährmedium bestand aus Dulbecco's MEM (DMEM, Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland), versetzt mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco-BRL) und 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, Gibco-BRL). Es wurde im Abstand von 2 – 3 Tagen gewechselt. Wachstum und Zustand der Zellen wurden lichtmikroskopisch verfolgt.

Bei konfluentem Zellrasen wurden die adhärenz gewordenen Zellen abgelöst und verdünnt wieder ausgesät: Dazu wurde das Medium abgesaugt und letzte Spuren von Medium mit 10 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, Gibco-BRL) gewaschen. Anschließend folgte eine circa 3-minütige Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA (1fach) Lösung (Gibco-BRL) bei 37 °C. Die somit erhaltene Zellsuspension wurde mit dem oben aufgeführten Nährmedium verdünnt (z. B. 1 : 10 oder 1 : 20), gut durchmischt und in neue Gewebekulturflaschen passagiert bzw. für Experimente in 6-Well-Gewebekulturplatten (3 ml Zellsuspension pro Well) oder in 10-cm-Gewebekulturschalen (je 10 ml Zellsuspension) überführt.

Da durch die Trypsin-EDTA (1fach) Lösung die Zellen nicht nur vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst werden, sondern auch die Rezeptoren auf den Zelloberflächen angedaut werden können, wurde bis zum Start der Experimente mindestens 2 Tage gewartet, um deren Rekonstitution zu ermöglichen.

Am Tag des Starts der Experimente wurde vorher das Nährmedium gewechselt, wobei für die Mehrzahl der Experimente das oben genannte Medium (DMEM, Penicillin, Streptomycin, 10 % FCS) Verwendung fand. Einzige Ausnahme davon bildeten die Experimente zum Nachweis von IL-18BP im (Nährmedium-) Überstand mittels Western Blot. Hierbei wurde ein serumfreies Medium (d. h. ohne FCS), bestehend nur aus DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, verwendet. Mit diesem serumfreien Medium war durch eine geringere Gesamtproteinkonzentration im Überstand eine stärkere Ankonzentrierung bei der folgenden Präzipitation möglich. Je 5 ml des serumfreien Mediums wurden unmittelbar vor Stimulation der Zellen hinzugefügt, nachdem das alte Medium vollständig abgesaugt und die verwendeten 10-cm-Gewebekulturschalen 3-mal mit je 15 ml PBS gewaschen worden waren.

Die Stimulation der Zellen mit den jeweiligen Agenzien erfolgte indem eine 100fach konzentrierte Stammlösung dieser Agenzien hergestellt wurde. Davon wurde dann ein Volumen das dem hundertsten Teil des Volumens an Medium in den Wells entsprach, in eben diese Wells pipettiert, um so die 1fache Endkonzentration zu erreichen.

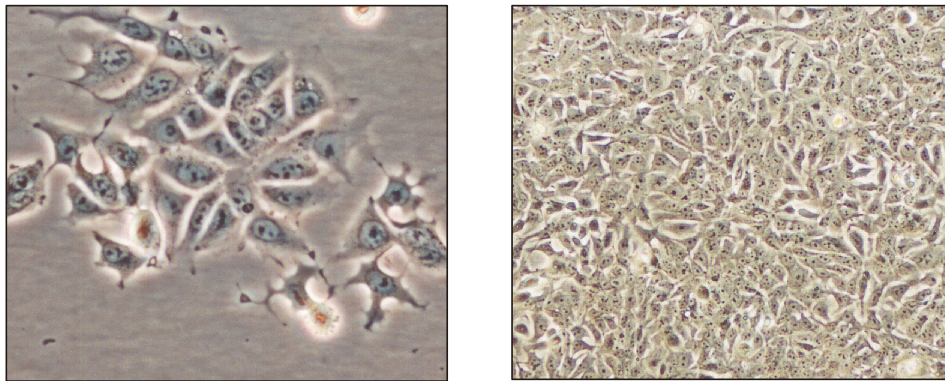


Abb. 2.1: DLD-1 Zellen in Kultur. Links: In starker Vergrößerung einen Tag nach der verdünnten Aussaat. Rechts: Konfluenten Zellrasen kurz vor einer Stimulation.

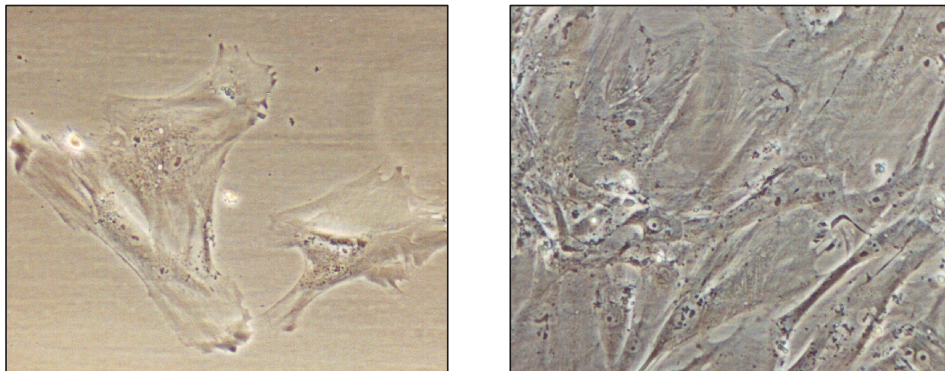


Abb. 2.2: Primäre humane Mesangiumzellen in Kultur.

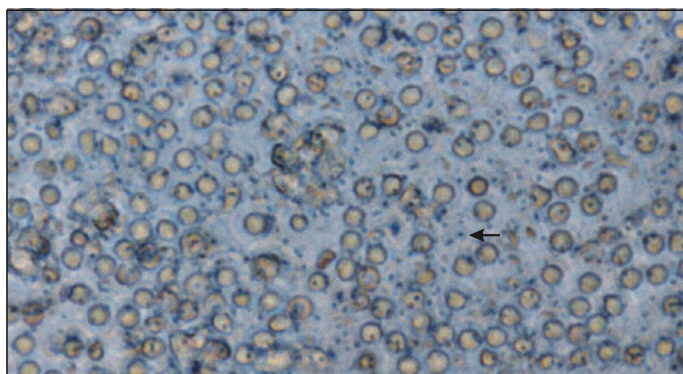


Abb. 2.3: PBMCs auf Transwell-Clear Inserts bei einem Kokultur-Experiment. Die Poren des Filters sind z. T. als kleine dunkle Punkte erkennbar (Pfeil).

Alle Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung von mikrobiellen Kontaminationen an einer Sterilbank (Hera safe, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) und mit sterilem Arbeitsmaterial durchgeführt.

### 2.1.2 Primäre humane Mesangiumzellen (hMZ)

Die primären humanen Mesangiumzellen (siehe Abb. 2.2) wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. H. Radeke (*pharmazentrum frankfurt*). Es handelte sich um Zellen, die aus Kollagenase IV behandelten menschlichen Glomeruli isoliert und nach einem bereits beschriebenen Verfahren aufbereitet und charakterisiert worden waren [207]. Die Experimente wurden durchgeführt mit Mesangiumzellen von zwei verschiedenen Donoren.

Die Zellen wurden kultiviert in RPMI 1640 mit Glutamax-1 (Gibco-BRL), versetzt mit 25 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 6 µg/ml Insulin, 3 µg/ml Transferrin, 3 ng/ml Natriumselenit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) und 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS. Dieses Medium fand auch für die Experimente Verwendung. Ansonsten war die Vorgehensweise die Gleiche wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben.

### 2.1.3 Primäre humane Fibroblasten

Die primären humanen Fibroblasten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau PD Dr. A. Huwiler (*pharmazentrum frankfurt*).

Die Zellen wurden kultiviert in Dulbecco's MEM versetzt mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS. Für die Experimente wurde ebenfalls das gleiche Medium verwendet. Die Vorgehensweise war ansonsten die Gleiche wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben.

### 2.1.4 Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs)

Die PBMCs (siehe Abb. 2.3) wurden frisch isoliert aus dem Blut von gesunden Freiwilligen, die mindestens seit 2 Wochen vor Blutentnahme keine Medikamente eingenommen hatten. Die Experimente waren zugelassen von der *Ethik Kommission* des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Das Protokoll der Isolation umfasste folgende Schritte:

1. Den Freiwilligen wurden 30 – 40 ml venöses Blut in heparinisierte Blutentnahmeröhrchen (NH<sub>4</sub>-Heparin, Sarstedt Monovette) abgenommen.
2. 15 ml vorgewärmtes (37 °C) Histopaque 1077 (Sigma) wurden in (50 ml-) Leuco Sep Filterröhrchen (Greiner) pipettiert und 30 s bei 1000 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland), um die Flüssigkeit unterhalb des Filters zu bringen.



3. 13 ml vorgewärmtes PBS und das heparinisierte frisch entnommene Blut wurden in die Leuco Sep Filterröhrchen pipettiert und 15 min bei 1900 rpm ungebremst zentrifugiert, um die gewünschte Auftrennung der Blutzellen zu erreichen.
4. Die PBMCs bildeten nun eine Schicht von 0,2 – 0,5 cm Stärke und wurden anschließend möglichst vollständig in neue (50ml-) Röhrchen (Falcon) transferiert.
5. In diese Röhrchen wurden 40 ml vorgewärmtes PBS gegeben, die Zellen resuspendiert und 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert, so dass sich am Boden der Röhrchen ein Zellpellet bildete, über dem das PBS abgesaugt werden konnte. Dieses „Waschen“ wurde 2-mal durchgeführt.
6. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl: Die PBMCs wurden in 10 ml PBS resuspendiert und aus dieser Suspension wurde eine Stichprobe von 50  $\mu$ l mit 50  $\mu$ l 0,3 N Essigsäure in einem Eppendorfcup vereinigt. Durch die Essigsäure sollten etwaig vorhandene Erythrozyten beseitigt werden, so dass diese nicht fälschlicherweise in die Zellzählung einbezogen wurden. Mit Hilfe einer Zählkammer und des Lichtmikroskops erfolgte eine manuelle Auszählung und davon ausgehend die Berechnung der Gesamtzahl der isolierten PBMCs (die Ausbeute war circa  $1 \times 10^6$  pro 1 ml Vollblut).
7. Die PBMCs wurden wiederum 5 min bei 1100 rpm herunterzentrifugiert und in einem errechneten Volumen vorgewärmten Mediums resuspendiert, um eine gewünschte Zellkonzentration (z. B.  $2 \times 10^6$  PBMCs pro ml) zu erhalten.

Als Medium wurde RPMI 1640 mit 25 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (Gibco-BRL) und 1 % (v/v) hitzeinaktiviertem humanen AB Serum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet.

Experimente von PBMCs allein wurden in Polypropylen-Röhrchen (Greiner) durchgeführt.

### 2.1.5 Kokulturen von PBMCs/DLD-1 und PBMCs/hMZ

Für die indirekten Kokulturen wurden DLD-1 Zellen oder humane Mesangiumzellen in 6-Well Polystyren-Gewebekulturplatten (Costar, Bodenheim, Deutschland) in den unter 2.1.1 bzw. 2.1.2 genannten Medien kultiviert. Vor dem Start der Experimente wurde das Medium nach Absaugen und 2-mal Waschen mit PBS durch unter 2.1.4 aufgeführtes Medium (RPMI, HEPES, Penicillin, Streptomycin, humanes Serum) ersetzt.

In die Wells wurden Transwell-Clear Inserts (0,4  $\mu$ m Porengröße, Costar) platziert, die mit je  $4 \times 10^6$  frisch isolierten PBMCs (in dem unter 2.1.4 aufgeführtem Medium) versehen wurden.

In diesen Kokulturen war somit ein Signalaustausch zwischen PBMCs und DLD-1 Zellen bzw. hMZ durch Diffusion der gebildeten Immunbotenstoffe möglich, während direkte Zell-Zellkontakte zwischen PBMCs und den ortsständigen Zelltypen durch die Transwell-Clear Inserts mit ihrer subzellulären Porengröße verhindert wurden. (Siehe auch Abb. 3.13 im Ergebnisteil für ein Schema über das Prinzip der indirekten Kokulturen.)

### 2.1.6 Humane Mesangium-Zelllinie

Eine humane Mesangium-Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. D. Schlöndorff (Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt [208].

Als Nährmedium für die Kultivierung als auch für die Experimente diente wiederum DMEM, versetzt mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS.

Die Vorgehensweise war ansonsten die Gleiche wie unter 2.1.1 beschrieben.

### 2.1.7 U937 Monozyten-Zelllinie

Die humane promonozytische U937 Zelllinie stammte von der American Type Tissue Collection (Rockville, MD, USA).

Die Zellen wurden kultiviert in RPMI 1640 mit Glutamax-1, versetzt mit 25 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS.

Da es sich bei U937 Zellen um Suspensionszellen handelt, die im Gegensatz zu DLD-1 Zellen, Mesangiumzellen und Fibroblasten nicht durch Bildung extrazellulärer Matrix am Boden der Gewebekulturflaschen adhärent werden, waren bei der Kultivierung andere Arbeitsschritte erforderlich:

Zur Passagierung wurde aus den Gewebekulturflaschen 2-mal pro Woche 1/10 des Volumens entnommen und in einer neuen Flasche mit 9/10 des frischen Mediums verdünnt.

Für Experimente wurde ein Aliquot entnommen und mit einer Zählkammer (wie unter 2.1.4 beschrieben) die Zellkonzentration in den Flaschen errechnet, so dass ein Volumen mit der benötigten Anzahl von Zellen in ein (50ml-) Röhrchen (Falcon) entnommen werden konnte. Dieses wurde 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, um ein Zellpellet am Boden des Röhrchens zu erzeugen, über dem das nun zellfreie Medium abgesaugt wurde. Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellen in einem errechneten Volumen neuen Mediums, um eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  pro ml zu erreichen. Bei den Experimenten wurden dann 2 ml dieser Zellsuspension pro Versuchsbedingung verwendet. Nach dem Verteilen der Zellsuspension auf die Gewebekulturplatten wurde 4 Stunden bis zum Start der Experimente gewartet.

## 2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

### 2.2.1 Das Funktionsprinzip des ELISA

#### Einige einleitende Überlegungen:

*Alle in dieser Dissertation dargelegten Nachweismethoden (ELISA, Western Blot, RT-PCR, RNase Protection Assay) weisen von ihrem Prinzip her Gemeinsamkeiten auf. Die Intention des Wissen-*

*schaftlers ist es immer ein bestimmtes Protein oder eine bestimmte Nukleinsäure zu detektieren. Darin sieht er sich jedoch zuerst zwei Schwierigkeiten ausgeliefert:*

- 1. In der zu detektierenden Probe kommt leider nicht nur dieses gesuchte Protein bzw. diese gesuchte Nukleinsäure, sondern eine Vielzahl chemisch ähnlicher Proteine bzw. Nukleinsäuren vor.*
- 2. Das gesuchte Protein (bzw. die gesuchte Nukleinsäure) ist selbst „unsichtbar“, und viel wichtiger noch: Es existiert in der Probe oftmals in einer nur verschwindend geringen Menge. In allen oben genannten Nachweismethoden finden diese beiden Schwierigkeiten jedoch entsprechende Antworten:*

*Add. 1.: SPEZIFITÄT: Man benötigt einen „Stoff“, welcher an das gesuchte Protein bzw. die Nukleinsäure bindet, sonst aber im Idealfall mit keinem anderen Protein bzw. keiner anderen Nukleinsäure interagiert. Zum Nachweis von Proteinen behilft man sich hierbei heutzutage meistens mit Antikörpern, während man für Nukleinsäuren mit geringem Aufwand einen komplementären Nukleinsäurestrang herstellen kann.*

*Add. 2.: SENSITIVITÄT: Alle in dieser Dissertation beschriebenen Nachweismethoden beinhalten einen VERSTÄRKUNGSMECHANISMUS, der es ermöglicht aus einer geringen Menge des gesuchten Proteins / Nukleinsäure, ein wahrnehmbares Signal zu erzeugen. Beim ELISA und Western Blot sind es Enzyme, die pro Molekül des gesuchten Proteins sehr, sehr viele Substratreaktionen katalysieren. Bei der PCR wird die gesuchte Nukleinsäure selbst exponentiell vervielfältigt, während beim RNase Protection Assay eine Bindung an eine starke „Lanterne“ in Form der komplementären radioaktiven RNA erfolgt.*

*Schließlich wird die Anwesenheit des gesuchten „unsichtbaren“ Moleküls noch in ein optisches Signal (Lichtabsorption, Schwärzung eines Photofilms, etc.) übersetzt.*

Der ELISA ist eine spezifische und hochsensitive Methode, die zum Nachweis eines Proteins wie beispielsweise eines Zytokins, verwendet werden kann. Bei den hier verwendeten Sandwich-ELISAs wird zuerst ein Antikörper der spezifisch das Protein – in unserem Fall also z. B. Interferon- $\gamma$  oder IL-8 – bindet, an der Oberfläche der Wells (= „Reaktionsmulden“) niedergeschlagen, d. h. fixiert. Danach werden unspezifische Bindungsstellen für Proteine an der Plastikoberfläche der Wells noch durch einen Blockierungsschritt mit 10 % FCS beseitigt. Als Nächstes werden die Wells mit den Proben versehen, so dass der Antikörper sein zugehöriges Protein binden und damit quasi „herausfischen“ kann. Anschließend wird das restliche Probenmaterial gewaschen und danach mit einem Überschuss eines Zweit-Antikörpers inkubiert, der an ein anderes Epitop des herausgefischten Proteins andockt und an den das Vitamin Biotin gekoppelt ist. Gleichzeitig wird ein Konjugat aus Avidin und dem Enzym Peroxidase hinzugegeben, welches mit hoher Affinität an das Biotin des Zweit-Antikörpers bindet. Nach einer Stunde werden die Wells wiederum gewaschen und somit alle ungebundenen Zweit-Antikörper entfernt. Bei optimal eingestellten Verhältnissen korreliert nun die Menge an Zweit-Antikörper bzw. dem Enzym Peroxidase in den Wells mit der Menge des gesuchten Proteins. Jetzt gibt man eine Substratlösung für die Peroxidase hinzu, so dass in einer Redoxreaktion die Entstehung eines Farbstoffes katalysiert wird. Durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer definierten Wellenlänge und unter Berücksichtigung

einer Standardkurve kann schließlich die Konzentration des Proteins in der Probe berechnet werden. Die Sensitivität der hier verwendeten ELISAs ist dabei ausreichend, um Konzentrationen von nur einigen pg/ml zu detektieren! So lagen die Detektionsgrenzen in unverdünnten Proben für Interferon- $\gamma$  bei circa 30 pg/ml und für IL-8 bei circa 10 pg/ml.

### 2.2.2 Interferon- $\gamma$ ELISA

Die Messung von Interferon- $\gamma$  in Zellkulturüberständen erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Set (OptEIA™ Human IFN- $\gamma$  Set, Pharmingen) unter Berücksichtigung der Anweisungen des Herstellers.

Die Experimente wurden zu den angegebenen Zeitpunkten beendet, indem 1 ml der Zellkulturüberstände in Eppendorcups (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln, Deutschland) pipettiert und anschließend durch eine Zentrifugation (Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) von 5 min bei 2500 rpm, 4 °C und Überführen in neue Eppendorcups von Zellbestandteilen getrennt wurden. Die Überstände wurden noch am gleichen Tag im Interferon- $\gamma$  ELISA gemessen und zwischenzeitlich bei 4 °C oder auf Eis aufbewahrt.

Die Durchführung des ELISA gliederte sich in folgende Arbeitsschritte:

1. Einen Tag vorher wurde eine 1 : 300 Verdünnung des ersten Anti-human-IFN $\gamma$ -Antikörpers in Coatingpuffer (0,1 M Carbonate, pH 9,5) vorbereitet. Von dieser Verdünnung wurden 100  $\mu$ l pro Well in 96-Well-Platten (Greiner) pipettiert und somit der Anti-IFN $\gamma$ -Antikörper über Nacht an die Plastikoberflächen der Wells fixiert.
2. Der Coatingpuffer wurde ausgeschüttet und letzte Reste von Flüssigkeit durch Klopfen der Platte auf Zellstoffpapier beseitigt.
3. Um unspezifische Bindungsstellen für Proteine an den Plastikoberflächen abzusättigen, wurde für 1 Stunde mit 400  $\mu$ l pro Well Blockingpuffer (PBS mit 10 % FCS, pH 7,0) inkubiert.
4. In der Zwischenzeit wurden die Proben und die Verdünnungen für die Standardkurve vorbereitet:
  - a) Die unverdünnten Proben der stimulierten Versuchsbedingungen enthielten eine so hohe Interferon- $\gamma$  Konzentration, dass die Extinktion oftmals weit über der Standardkurve und somit dem aussagekräftigen Messbereich gelegen hätte. Deshalb wurde ein Aliquot aus jeder Probe vorher in Blockingpuffer verdünnt (z. B.: 1 : 3 oder 1 : 20). Dieser Verdünnungsfaktor konnte natürlich später bei Berechnung der absoluten Interferon- $\gamma$  Konzentration leicht wieder herausgerechnet werden.
  - b) Aus einem bei -70 °C tiefgefrorenem Aliquot des im Kit mitgelieferten Interferon- $\gamma$  Standards wurde eine Verdünnungsreihe mit den Werten 500, 250, 125, 62.5 und 31.25 pg/ml hergestellt. Die Verdünnung wurde entweder in Blockingpuffer oder bei schwachen Verdünnungen der Proben (z. B.: 1 : 3), zur Berücksichtigung einer etwaig denkbaren Interferenz des Nährmediums, in Blockingpuffer plus dem entsprechenden Verhältnis an ungebrauchtem Nährmedium (also z. B. auch 1 : 3) durchgeführt.
5. Die mit Blockingpuffer gefüllten Wells der 96-Well-Platten wurden 3-mal mit Waschpuffer (PBS, 0,05 % Tween-20) in einem ELISA-Washer (Model 1575, BioRad, München,

Deutschland) gewaschen und die Flüssigkeitsreste in den Platten auf Zellstoffpapier ausgeklopft.

6. In die Wells wurden je 100 µl der Werte für die Standardkurve, der „Blank“ – d. h. die Hintergrundflüssigkeit (siehe oben unter 4.b) der Standardkurve ohne Interferon-γ – und in einer Doppelbestimmung die verdünnten Proben aufgetragen. Es folgte eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur.
7. Die Wells wurden 6-mal, wie unter Punkt 5. beschrieben, gewaschen und mit je 100 µl „Working Detector“ für eine Stunde bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Der Working Detector bestand aus dem in Blockingpuffer verdünnten zweiten biotinylierten Anti-human-IFNγ-Antikörper (Verdünnung 1 : 300) und dem Avidin-Peroxidase-Konjugat (Verdünnung 1 : 300).
8. Es wurde 9-mal, wie unter Punkt 5. beschrieben, gewaschen und je 100 µl Substratlösung (Tetramethyl-Benzidine [TMB] Liquid Substrate System, Sigma) in die Wells pipettiert.
9. Die nun in Dunkelheit ablaufende Farbreaktion wurde nach circa 10 min mit 50 µl pro Well 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt.
10. Unverzüglich erfolgte nun die computergestützte Messung der Extinktionen (Wellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 595 nm) und Berechnung der Interferon-γ Konzentrationen unter Einsatz eines ELISA-Readers (Microplate Reader, BioRad) und eines Softwareprogramms (Microplate Manager™, Version 4.0, BioRad).

### 2.2.3 Interleukin-8 ELISA

Das Chemokin Interleukin-8 (IL-8) wurde in Zellkulturüberständen ebenfalls mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Set (OptEIA™ Human IL-8 Set, Pharmingen), analog zu der unter 2.2.2 beschriebenen Messung von Interferon-γ, bestimmt. Zur Einsparung von Material wurden die beiden monoklonalen Anti-human-IL-8-Antikörper und das Avidin-Peroxidase-Konjugat in einer Verdünnung von 1 : 500 verwendet. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe der IL-8 Konzentrationen von 400, 200, 100, 50, 25 bis 12,5 pg/ml hergestellt.

Ansonsten entsprachen alle Arbeitsschritte der unter 2.2.2 beschriebenen Vorgehensweise.

## 2.3 Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

### 2.3.1 Das Prinzip der semiquantitativen RT-PCR

Die RT-PCR kann als Methode zur Detektion einer ausgesuchten zellulären mRNA eingesetzt werden. Darüber hinaus können Aussagen über Veränderungen in der Menge dieser mRNA getroffen werden, die z. B. auftreten können nachdem die Zellen mit einem beliebigen Faktor (z. B. einem Immunbotenstoff) stimuliert worden sind. Da eine mRNA die Bauanleitung für das

von ihr codierte Protein darstellt, können auch indirekt Hinweise über mögliche Veränderungen in der Menge dieses Proteins gewonnen werden.

Als sehr sensitive Methode eignet sich die RT-PCR besonders beim Vorhandensein von nur geringen Mengen an Zellmaterial, wie es z. B. bei Experimenten mit primären humanen Zellen (PBMCs, hMZ) der Fall ist.

Zur Durchführung der RT-PCR wird zuerst die gesamte RNA am Ende eines Zellkulturexperiments isoliert. Diese Gesamt-RNA besteht zu über 97 % aus ribosomaler RNA und man geht daher davon aus, dass sich die zelluläre Menge an Gesamt-RNA auch nach Stimulation mit einem beliebigen Faktor nicht ändert. Dies kann aber durchaus für die zu untersuchende mRNA eines bestimmten Proteins möglich sein und ist dann Gegenstand der Analyse.

Man muss davon ausgehen, dass die RNA-Isolation quantitativ nicht verlässlich bei allen Proben des Experiments die gleiche Ausbeute liefert, so dass man, um später quantitative Aussagen zwischen den Proben treffen zu können, in allen RNA-Isolaten des jeweiligen Experiments die Gesamt-RNA Konzentration photometrisch misst. Anhand der Ergebnisse dieser Messung kann eine für alle Proben des Experiments gleiche Menge an Gesamt-RNA für das Umschreiben zu komplementärer einzelsträngiger DNA (cDNA) durch das Enzym Reverse Transcriptase eingesetzt werden.

Mit dieser cDNA führt man nun eine PCR für die zu untersuchende Nukleinsäure durch:

Die Spezifität wird durch Auswahl von zwei sogenannten Primern festgelegt, welche kurze Oligonukleotide mit komplementärer Sequenz zu Bereichen der ausgesuchten Nukleinsäure darstellen, sonst aber im Idealfall an keine anderen Nukleinsäuren der Proben binden können. Die Primer bilden die unentbehrlichen Startpunkte für die Synthese eines Nukleinsäurestranges durch das Enzym Polymerase, so dass im Wesentlichen ausschließlich eine Vermehrung des ausgesuchten Nukleinsäureabschnitts stattfindet. Durch wiederholtes Erhitzen und Abkühlen können immer neue Abschriften dieses Abschnitts synthetisiert werden, wobei die Kopien des vorangegangenen Zyklus mitbenutzt werden, so dass sich die Anzahl der Kopien pro Zyklus theoretisch verdoppeln kann und sich durch eine exponentielle Funktion beschreiben lässt. Das erklärt die unglaubliche Sensitivität der PCR, aber auch ihre Störanfälligkeit gegenüber Verunreinigungen.

Eine mögliche Verunreinigung wäre z. B. das Auftreten von genomischer DNA bei der RNA-Isolation. Deshalb werden bevorzugt zwei Primer gewählt, die in verschiedenen Exons des gesuchten Gens liegen. Da in der mRNA die zwischen den Exons liegenden Introns durch Splicing entfernt worden sind, besitzen dann das PCR-Amplifikat von der genomischen DNA und das PCR-Amplifikat von der gesuchten mRNA verschiedene Längen und können deshalb auseinandergehalten werden.

Die Vermehrung der gesuchten Nukleinsäure ist übrigens nur solange möglich, bis alle Reagenzien die zur Synthese nötig sind, im Reaktionsgefäß verbraucht sind. Das impliziert aber auch, dass trotz unterschiedlicher Ausgangsmengen der gesuchten Nukleinsäure in den einzelnen Proben, nach einer hinlänglich großen Anzahl von Zyklen irgendwann in allen Proben eine Sättigung mit einer gleichen Endmenge an vermehrter Nukleinsäure erreicht werden würde. Damit quantitative Aussagen getroffen werden können, darf also die Zahl der

Zyklen nicht zu groß gewählt sein, um nicht außerhalb des linearen Bereichs der PCR zu liegen.

Um die Amplifikate der PCR sichtbar zu machen, werden sie in einem Agarose-Gel nach ihrer Basenanzahl aufgetrennt. Das Agarose-Gel und der verwendete Laufpuffer enthalten Ethidiumbromid, welches sich in doppelsträngige DNA einlagert und unter UV-Licht eine Fluoreszenz der DNA-Banden erzeugt.

Angenommen die PCR für die zu untersuchende Nukleinsäure liefert in zwei unterschiedlichen Proben eines Experiments Banden verschiedener Stärke, so ist dies ein Indiz für Änderungen in der Menge der analysierten mRNA. Es könnte allerdings dann ein Artefakt sein, wenn die durchgeführte photometrische Messung der Gesamt-RNA ungenau war und deshalb ungewollt in den beiden Proben unterschiedliche Mengen RNA zur Reversen Transcription eingesetzt worden sind oder die Reverse Transcription in beiden Proben nicht die gleiche Effizienz besaß. Aufgrund dieser Überlegungen führt man eine Kontrolle durch, ob nach der Reversen Transcription wirklich in beiden Proben eine gleiche Menge an Gesamt-cDNA vorhanden ist. Dies geschieht indem man jeweils eine PCR dieser cDNAs mit Primern für die Nukleinsäure von z. B. Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchführt. Man setzt dabei voraus, dass sich die zelluläre Menge an mRNA für ein solches „housekeeping gene“ wie GAPDH auch bei Stimulation der Zellen mit einem beliebigen Faktor nicht ändert. Um aussagekräftige Resultate zu erhalten, muss natürlich auch für GAPDH die Zyklenzahl der PCR im linearen Bereich liegen, da sich bei zu vielen Zyklen real vorhandene Unterschiede in der Gesamt-cDNA Menge artifiziell angleichen würden.

Erst durch gleichzeitigen Vergleich der Bandenstärken der verschiedenen Proben für die ausgesuchte Nukleinsäure und für die Nukleinsäure von z. B. GAPDH können semiquantitative Aussagen getroffen werden.

### 2.3.2 RNA-Isolation, Reverse Transcription und PCR

#### Schritt 1: RNA-Isolation und Photometrie

Die RNA wurde nach der im Folgenden beschriebenen Phenol/Chloroform-Methode isoliert und alle Arbeitsschritte zur Vermeidung von Kontaminationen mit sterilem / autoklaviertem Arbeitsmaterial durchgeführt:

1. a) Experimente mit adhärenenten Zellen (DLD-1, Mesangiumzellen, Fibroblasten) wurden auf 6-Well-Gewebekulturplatten durchgeführt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Experimente beendet, indem das Medium vollständig abgesaugt oder in Eppendorfcups überführt und die Zellen mit 1 ml pro Well Tri-Reagent (enthält Phenol, Sigma) lysiert wurden. Nach circa 10 min wurde das Lysat in Eppendorfcups überführt und gegebenenfalls bis zur Weiterverarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.
1. b) Bei Experimenten mit Suspensionszellen (U937, PBMCs) wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min bei 1000 rpm) als Zellpellet am Boden eines Eppendorfcups abgeschieden, das darüber liegende nun zellfreie Medium möglichst vollständig ab-

gesaugt, die Zellen mit 0,5 ml Tri-Reagent lysiert und anschließend genauso verfahren wie bei Experimenten mit adhären Zellen.

2. Die Lysate wurden durch hoch- und herunterziehen mit der Pipette homogenisiert. Pro 1 ml Tri-Reagent wurde 0,2 ml Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt, 30 s durch Invertieren gemischt und die Eppendorfcups 10 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen.
3. Es folgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4 °C, Biofuge fresco, Heraeus Instruments), nach der sich die gesamte RNA in der oberen durchsichtigen Phase befand.
4. Diese Phase wurde sukzessive, ohne Kontaminationen durch die unteren Schichten (enthalten genomische DNA und Proteine), in neue Eppendorfcups abpipettiert.
5. Es folgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol, 30 s Mischen durch Schütteln, 5 min stehen lassen bei RT und anschließende Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4 °C). Die RNA war nun als weißliches Pellet am Boden der Eppendorfcups sichtbar.
6. Das Isopropanol wurde entfernt und mit 1 ml 75%igem eiskaltem Ethanol gewaschen, indem wiederum zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4 °C) wurde.
7. Da Ethanol jedoch die Reverse Transcription behindert, wurde es nun möglichst vollständig abpipettiert und die RNA-Pellets 5 min bei 37 °C in einem Thermoblock (Thermomixer compact, Eppendorf) getrocknet.
8. Die RNA wurde in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgelöst, wobei 5 min bei 56 °C in einem Thermoblock inkubiert wurde. Das Volumen an DEPC-H<sub>2</sub>O (10 µl – 120 µl) richtete sich nach der Größe des RNA-Pellets.
9. Die gelöste RNA wurde in neue Eppendorfcups überführt und immer auf Eis gehalten. Zur Aufbewahrung wurde sie bei –20 °C eingefroren.

Zur Bestimmung der jeweiligen Gesamt-RNA Konzentrationen wurden 2 µl RNA-Lösung jeder Probe in 70 µl DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt und photometrisch die Optische Dichte (OD) gemessen (Gene Quant II, RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech).

Mit der folgenden Formel wurde die RNA Konzentration berechnet:

$$[\text{RNA}] = \text{OD} \times 36 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 40 (\text{spez. OD für RNA})$$

Anhand des Gesetzes **Volumen = Menge : Konzentration** konnte für jede Probe ein Volumen berechnet werden, in welchem sich eine für alle Proben gleiche Menge Gesamt-RNA befand, welche in die Reverse Transcription einzusetzen war. Diese Menge variierte bei den einzelnen Experimenten je nach Ausbeute an isolierter Gesamt-RNA zwischen 250 ng – 1000 ng.

### Schritt 2: Reverse Tanscription (RT)

Zuerst wurden die bei –20 °C gelagerten Reagenzien (PCR reagents, Perkin Elmer) aufgetaut und ein Mastermix hergestellt:



## 2 Material und Methoden

Reagenz	Pro Reaktion
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4,0 µl
10fach PCR-Puffer	2,0 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	1,0 µl
dATP (10 mM)	2,0 µl
dTTP (10 mM)	2,0 µl
dCTP (10 mM)	2,0 µl
dGTP (10 mM)	2,0 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1,0 µl
Random Hexamers (50 µM)	1,0 µl
MuLV Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0 µl
	<u>= 18 µl</u>

Je 18 µl des Mastermixes wurden auf PCR-Reaktionsgefäße (MicroAmp®, Perkin Elmer) verteilt und jeweils mit dem – wie oben beschrieben – errechneten Volumen Gesamt-RNA versehen, welches 2,0 µl nicht überschreiten sollte. Ein Volumenunterschied von mehr als 1,0 µl zwischen den verschiedenen Proben / Reaktionsansätzen wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O ausgeglichen.

Zur Kontrolle auf Nukleinsäure-Kontaminationen der Reagenzien oder des Arbeitsmaterials wurde immer ein Reaktionsansatz mit DEPC-H<sub>2</sub>O (ohne RNA) als Negativkontrolle versehen und mit dieser sogenannten H<sub>2</sub>O-Kontrolle analog auch die anschließende PCR durchgeführt. Die Ansätze wurden durch kurzes Zentrifugieren gemischt und folgendes Thermocycler-Programm (GeneAmp® PCR System 2400, Perkin Elmer) durchgeführt: 40 °C für 30 min; 99 °C für 5 min. Die RT-Produkte wurden anschließend auf 4 °C gekühlt gelagert.

### Schritt 3: PCR

Für die PCR wurde ebenfalls ein Mastermix hergestellt und dann je 43 µl auf PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Der Mastermix hatte bei den PCRs für GAPDH und IL-18BP bzw. IL-18 leicht unterschiedliche Zusammensetzung (siehe dafür 2.3.3 – 2.3.5). An den Innenrand der PCR-Reaktionsgefäße wurden 5 µl des entsprechenden Primermix (siehe 2.3.3 – 2.3.5) sowie 2 µl der RT-Produkte pipettiert und zum Mischen kurz zentrifugiert. Ohne Verzögerung wurde dann das entsprechende Thermocycler-Programm (GeneAmp® PCR System 9600 oder 9700, Perkin Elmer; siehe 2.3.3 – 2.3.5) gestartet und die PCR-Produkte anschließend bei 4 °C gelagert.

Für die Gelelektrophorese wurde ein Agarose-Gel aus 2 % Agarose, TBE-Puffer und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid durch Aufkochen hergestellt.

Je 8 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl Ladepuffer (Bromphenolblau, Glycerol) gemischt und davon 9 µl in die Taschen des Gels aufgetragen. Als Größenmarker diente eine 100 bp DNA-Leiter (GeneRuler™, MBI Fermentas).

Die DNA wurde 30 min bei 120 V Spannung aufgetrennt (Electrophoresis Power Supply EPS 600, Pharmacia Biotech). Im Folgenden wurden die Gele computergestützt mit einer UV-Gel-Kamera (Gel Doc 1000, BioRad) und einem Softwareprogramm (Molecular Analyst® Software, Version 1.5, BioRad) aufgenommen und als Bilddateien abgespeichert.

### 2.3.3 PCR Protokoll für GAPDH

Die Sequenzen der Primer (Gibco-BRL) für die Untersuchungen der GAPDH mRNA waren:

1. (Forward Primer): ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
2. (Reverse Primer): TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

Das daraus resultierende PCR-Amplifikat hatte eine Länge von 452 bp. Pro PCR-Reaktionsgefäß wurden 5 µl dieses Primermix mit einer Konzentration beider Primer von jeweils 5 µM eingesetzt.

Der Mastermix setzte sich aus folgenden Reagenzien (PCR reagents, Perkin Elmer) zusammen:

Reagenz	pro Reaktion
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
10fach PCR-Puffer	5,0 µl
Autoklaviertes-H <sub>2</sub> O	31,1 µl
dATP (10mM)	1,0 µl
dTTP (10mM)	1,0 µl
dCTP (10mM)	1,0 µl
dGTP (10mM)	1,0 µl
AmpliTa <sup>®</sup> Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
	<u>= 43 µl</u>

Es wurde das folgende Thermocycler-Programm für die PCR von GAPDH durchgeführt: 94 °C für 1 min (1 Zyklus); 94 °C für 1 min, 60 °C für 1 min, 72 °C für 2 min (23 – 24 Zyklen); finale Extensionsphase bei 72 °C für 7 min. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf 4 °C gekühlt aufbewahrt.

### 2.3.4 Etablierung einer RT-PCR für Interleukin-18-Bindungsprotein

Im Rahmen der ersten Anstrengungen eine RT-PCR für die Detektion von Interleukin-18-Bindungsprotein mRNA zu etablieren, wurden zuerst folgende zwei Primer (Gibco-BRL)

## 2 Material und Methoden

gemäß den veröffentlichten IL-18BP Sequenzen ([191], *National Center for Biotechnology Information* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]) eingesetzt:

1. (Forward Primer): CAC CTC CCA GGC CGA CTG TG
2. (Reverse Primer): TTA ACC CTG CTG CTG TGG AC

Für die Auswahl der Primer wurden die üblichen Regeln des Primerdesign berücksichtigt [209]. Die berechnete Länge des Amplifikats für die IL-18BP mRNA betrug 261 bp und die Primerbindungsstellen lagen in verschiedenen Exons des zugehörigen Gens.

Als Polymerase für die PCR wurde im ersten Ansatz herkömmliche AmpliTaq® Polymerase verwendet.

Diese PCR wurde mit RT-Produkten von primären humanen Mesangiumzellen durchgeführt und wurde mit einer Annealing-Temperatur von 54 °C und mit 35 Zyklen gefahren. Neben einer Menge an „DNA-Schmier“ lieferte sie mehrere distinkte Banden, von denen zwei eine passende Größe bei etwa 250 – 260 bp aufwiesen (siehe Abb. 2.4A). Im nächsten Schritt wurde die Spezifität der PCR durch Veränderung folgender Parameter erhöht:

1. Anstelle der AmpliTaq® Polymerase wurde die AmpliTaq Gold™ Polymerase verwendet. Diese Polymerase gewinnt ihre katalytische Aktivität erst nach einigen Minuten Erhitzung auf 94 °C („hot start“) zu Beginn des Thermocycler-Programms. Dadurch werden unspezifische Primerhybridisierungen in der kurzen Zeit nach dem Zusammenbringen von Mastermix, Primer und Probe bis zum Start der PCR vermieden.
2. Die Annealing-Temperatur wurde sukzessive auf 58 °C erhöht, um die Spezifität der Primerbindung zu verbessern.
3. Die MgCl<sub>2</sub> Menge pro Reaktion wurde von 3,0 µl auf 2,7 µl erniedrigt.

Der Mastermix für die IL-18BP PCR sah dementsprechend wie folgt aus:

Reagenz	pro Reaktion
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,7 µl
10fach PCR-Puffer	5,0 µl
Autoklaviertes-H <sub>2</sub> O	30,9 µl
dATP (10 mM)	1,0 µl
dTTP (10 mM)	1,0 µl
dCTP (10 mM)	1,0 µl
dGTP (10 mM)	1,0 µl
AmpliTaq Gold™ Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
	<u>= 43 µl</u>

Unter Einbeziehung der oben beschriebenen Veränderungen wurde folgendes Thermocycler-Programm für die PCR von IL-18BP durchgeführt: 94 °C für 10 min (1 Zyklus, „hot start“); 94 °C für 1 min, 58 °C für 1 min, 72 °C für 2 min (32 – 35 Zyklen); finale Extensionsphase bei 72 °C für 7 min. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf 4 °C gekühlt aufbewahrt.

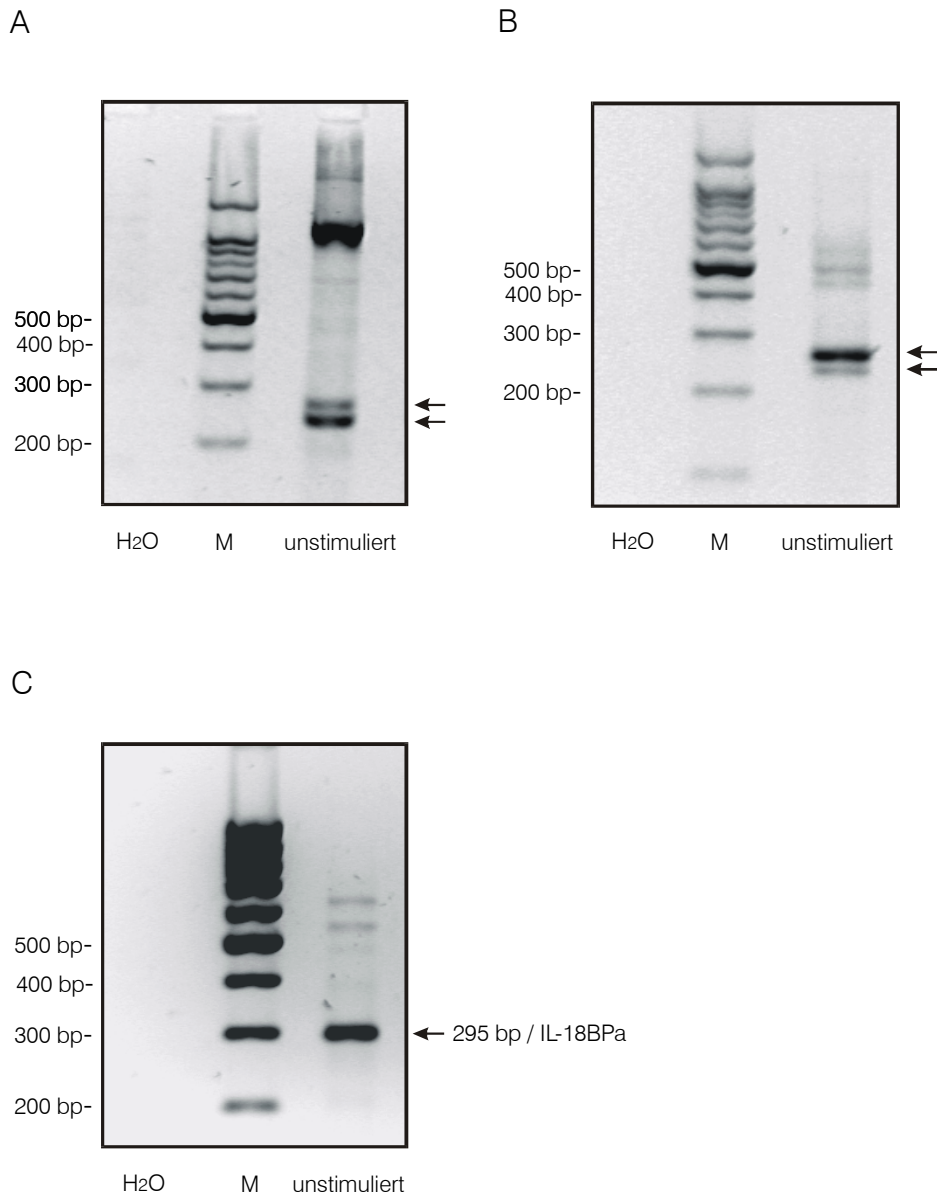


Abb. 2.4: Etablierung einer IL-18BP PCR.

(A) Die erste durchgeführte PCR zeigte viel DNA-Schmier und mehrere Banden von denen zwei in etwa die erwartete Größe hatten (Pfeile).

(B) Nach Erhöhung der Annealing-Temperatur und "hot start" traten der DNA-Schmier und einige Banden nicht mehr auf.

(C) Bei der endgültigen PCR zeigte sich nach Design eines anderen Forward Primer im Vergleich zu Abb. 2.4B nur noch eine einzelne Bande mit der errechneten Amplifikatlänge für IL-18BP<sub>a</sub>. Die Sequenzierung bestätigte, dass es sich tatsächlich um IL-18BP<sub>a</sub> Nukleinsäure handelte. (Durch einen Verstärkungsmodus der UV-Gelkamera + Software sind alle Banden besonders intensiv dargestellt.)

Die freien H<sub>2</sub>O-Negativkontrollen bezeugen die Abwesenheit von Kontaminationen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker.

Als Ergebnis dieser Modifikationen verschwanden einige Banden und der DNA-Schmier während die beiden Banden bei circa 250 – 260 bp erhalten blieben (siehe Abb. 2.4B).

Um zu klären, ob diese zwei Banden wirklich IL 18BP Nukleinsäure zuzuordnen waren, wurden sie im Anschluss sequenziert, indem sie zuerst separat mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten wurden. Es folgte die Aufreinigung der DNA mit Hilfe des QIAquick™ Gel Extraktion Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Mit dieser aufgereinigten DNA wurde nochmals eine PCR mit obenstehenden Primern durchgeführt, allerdings mit Pfu-Polymerase und einem an dieses Enzym angepassten Thermocycler-Programm. Es folgte eine Ethanol-Fällung des PCR-Produkts und eine nicht-radioaktive Sequenzierung nach dem Prinzip der Didesoxynukleotid-Methode. Im Rahmen dessen wurde ein Sequenzierungs-Programm (96 °C für 10 s, 55 °C für 5 s, 60 °C für 3 min [30 Zyklen]; GeneAmp® PCR System 2400, Perkin Elmer) mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden und nachfolgender Detektion mit einem automatischen Sequenziergerät (310 Genetic Analyser, Perkin Elmer) durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte anhand der Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Als Ergebnis der Sequenzierung stellte sich heraus, dass das längere der beiden PCR-Amplifikate tatsächlich der Isoform a des humanen IL-18BP entsprach, während demgegenüber das kürzere Amplifikat überraschenderweise keinerlei Übereinstimmung bezüglich IL-18BP, sondern zu der Nukleinsäure des Matrixproteins Fibrillin aufwies. *(Es zeigte sich hier wie sinnvoll und notwendig die Sequenzierung zur Überprüfung der Spezifität der RT-PCR ist!)*

Da das kürzere Amplifikat unerwünscht war, wurde kurzerhand ein anderer Forward Primer entworfen, während der Reverse Primer beibehalten wurde. Die Primersequenzen lauteten:

3. (Forward Primer): CCT CTA CTG GCT GGG CAA TGG

4. (Reverse Primer): TTA ACC CTG CTG CTG TGG AC

Pro PCR-Reaktionsgefäß wurden 5 µl dieses Primermix mit einer Konzentration der Primer von jeweils 4 µM verwendet.

Mit diesem Primerpaar war theoretisch eine Detektion der mRNA für die Isoformen IL-18BP<sub>a</sub> (Länge des Amplifikats: 295 bp), IL-18BP<sub>c</sub> (Länge des Amplifikats: 526 bp) und die erst später beschriebene Isoform IL-18BP<sub>d</sub> (Länge des Amplifikats: 167 bp) möglich.

Die Hybridisierungsorte der Primer waren wiederum durch Intronbereiche innerhalb des IL-18BP Gens getrennt, so dass Verunreinigungen durch genomische DNA von den mRNA-Amplifikaten abgrenzbar waren.

Eine neuerliche PCR mit den oben zuletzt beschriebenen Parametern betreffend Mastermix und Thermocycler-Programm wurde durchgeführt. Es zeigte sich, dass mit dem neugewählten Primer nur noch eine Bande auf Höhe der erwarteten Länge von circa 295 bp auftrat (siehe Abb. 2.4C). Die Sequenzierung dieser Bande erbrachte, dass es sich wie erwartet um die Nukleinsäure für IL-18BP<sub>a</sub> handelte (siehe Abb. 2.5), womit die Etablierung der PCR abgeschlossen war.

Bei den Experimenten lagen die Zyklenzahlen der IL-18BP PCR in der Regel bei 32 – 33 Zyklen für DLD-1 sowie 35 Zyklen für Mesangiumzellen und Fibroblasten.

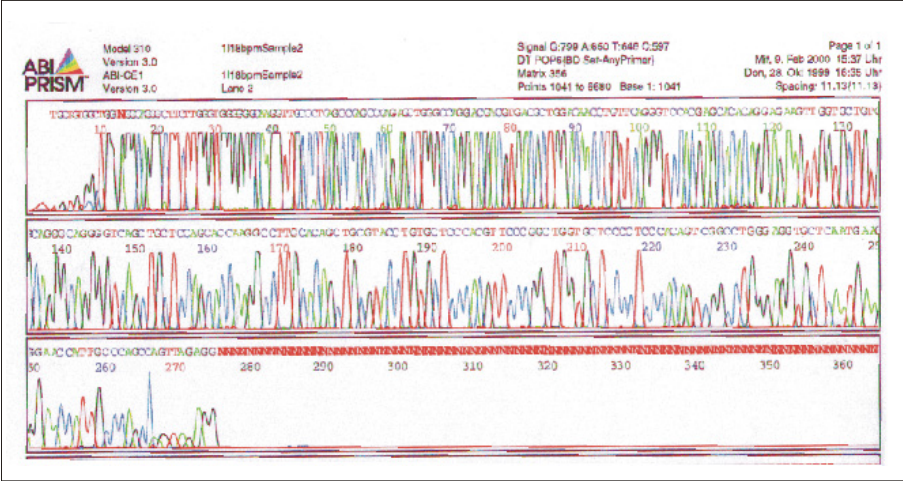


Abb. 2.5: Ergebnis der Sequenzierung des Amplifikats der IL-18BP PCR von Abb. 2.4C. Die Sequenz stimmte mit der veröffentlichten Basenabfolge der Nukleinsäure für IL-18BP<sub>a</sub> überein.

### 2.3.5 PCR Protokoll für Interleukin-18

Die Sequenzen der Primer für die Untersuchungen der IL-18 mRNA waren:

3. (Forward Primer): ACC AAG TTC TCT TCA TTG ACC
4. (Reverse Primer): TTG CAT CTT ATT ATC ATG TCC

Pro PCR-Reaktionsgefäß wurden 5 µl dieses Primermix mit einer Konzentration der Primer von jeweils 4 µM eingesetzt.

Für das PCR-Amplifikat berechnete sich eine Länge von 293 bp. Die Identität der Bande wurde durch Sequenzieren bestätigt.

Die Zyklenzahl lag bei 32 für DLD-1 Zellen und 36 für humane Mesangiumzellen. Im Übrigen wurden die gleichen Parameter für den Mastermix und das Thermocycler-Programm gewählt, wie zuletzt für die RT-PCR von IL-18BP aufgeführt (siehe Abschnitt 2.3.4).

## 2.4 RNase Protection Assay

### 2.4.1 Das Prinzip des RNase Protection Assay

Der RNase Protection Assay ist eine Methode mit welcher der Nachweis und die Quantifizierung einer spezifischen mRNA möglich ist. RNase Protection Assay und RT-PCR können also grundsätzlich bei den gleichen Fragestellungen eingesetzt werden. Dem Protection Assay kann eine gute Validität seiner quantitativen Ergebnisse zugesprochen werden. Allerdings kann er im Vergleich zur PCR als weniger sensitive Methode gelten. Dies begünstigt nicht

seinen Einsatz, wenn die Menge des zur Verfügung stehenden Zellmaterials begrenzt ist (z. B. bei primären humanen Zellen).

Die Strategie des Protection Assay für die Detektion einer gesuchten mRNA liegt in der Hybridisierung mit einer komplementären radioaktiv markierten RNA-Sonde.

Zur Herstellung dieser RNA-Sonde wird ein entsprechendes Segment cDNA in ein Plasmid stromabwärts eines Bakteriophagen-Promotors kloniert. Das rekombinante Plasmid kann nun durch ein Restriktionsenzym linearisiert werden und eine *In-vitro*-Transcription durch Zugabe einer RNA-Polymerase erfolgen. Die Sequenz und Orientierung des DNA-Segments führt dabei zur Transcription einer Antisense-RNA die zu (einem Teilstück) der gesuchten mRNA komplementär ist. Da die Transcription in Anwesenheit eines radioaktiven Nukleotids ( $[^{32}\text{P}]\text{rUTP}$ ) erfolgt, ist die Antisense-RNA über ihre ganze Länge radioaktiv markiert. Sie kann nun als spezifische Sonde eingesetzt werden, indem ein Überschuss an Antisense-RNA mit der von den Experimenten isolierten zellulären Gesamt-RNA inkubiert wird. Dabei kommt es zur Hybridisierung der gesuchten mRNA mit der Antisense-RNA. Anschließend wird durch die Zugabe von RNasen jedwede nicht hybridisierte einzelsträngige RNA, d. h. der Überschuss an radioaktiver Antisense-RNA, die Überhänge der RNA/RNA-Hybride, und alle sonstige Gesamt-RNA abgebaut. Nachfolgend können die durch die RNA/RNA-Hybridisierung übriggebliebenen „geschützten Fragmente“ nach ihrer Länge durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese von dem restlichen verdauten radioaktiven Material aufgetrennt werden.

Am Ende erfolgt die Autoradiographie, wobei das radioaktive Signal proportional zur Menge der gesuchten mRNA in den Proben ist. Als interne Kontrolle bzw. zur Äquilibration bezüglich der eingesetzten Gesamt-RNA Menge führt man die zusätzliche Detektion der mRNA für ein „housekeeping gene“ (z. B. GAPDH) durch.

### 2.4.2 Interleukin-18-Bindungsprotein und GAPDH RNase Protection Assay

Die zelluläre Gesamt-RNA aus den Experimenten wurde wie unter Abschnitt 2.3.2, Schritt 1 beschrieben isoliert. Es wurden pro Reaktionsansatz 20 µg Gesamt-RNA verwendet.

Die Klonierung, Linearisierung sowie die anschließende Synthese der mit  $[^{32}\text{P}]\text{rUTP}$  (800 Ci/mmol, Amersham) radioaktiv markierten RNA-Sonden für IL-18BP und GAPDH wurden freundlicherweise von Dr. Heiko Kämpfer durchgeführt [210]. Dabei wurde der Transcriptionsvektor pBluescript II KS (+) (Stratagene) und die RNA-Polymerasen T3 oder T7 (Boehringer Mannheim) verwendet. Die klonierten DNA-Segmente korrespondierten zu den Nukleotiden 457 – 644 von IL-18BP [191] und den Nukleotiden 148 – 302 von GAPDH [211]. Da die Längen der beiden geschützten Fragmente zu nahe beieinander lagen, erfolgte die Detektion von GAPDH und IL-18BP in getrennten Reaktionsansätzen.

Die Gesamt-RNA wurde in Eppendorfcups mit einem 2,5fachen Volumenüberschuss von Ethanol und einer Endkonzentration von 0,1 M NaOAc versehen. Es folgten die Zugabe der RNA-Sonde (100000 cpm, max. 10 µl), Vortexen, Fällung der RNA durch Inkubation bei –20 °C für 20 min und eine Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm, 4 °C. Anschließend wurde der Überstand, der eine nur geringe Radioaktivität aufweisen sollte, vollständig entfernt. Es

wurden 30 µl Hybridisierungspuffer (40 mM PIPES [pH 6,4], 1 mM EDTA [pH 8,0], 0,4 M NaCl, 80 % [v/v] deionisiertes Formamid) pro Eppendorfcup hinzugefügt. Das radioaktive RNA-Pellet wurde dann sehr gründlich (100-maliges hoch- und herunterziehen von 25 µl mit Hilfe der Pipette) aber vorsichtig resuspendiert. Für die Hybridisierung wurde nun zuerst für 15 min bei 85 °C denaturiert und danach über Nacht bei 42 °C im Wasserbad inkubiert.

Zur RNase Behandlung wurden jeweils 300 µl von einem „T1/A-Mix“ hinzugefügt. Dieser Mix setzte sich aus RNase-Puffer (300 mM NaOAc [pH 7,0], 10 mM Tris/HCl [pH 7,5], 5 mM EDTA [pH 8,0]) sowie 10 µg RNase A und 200 U RNase T1 in 300 µl dieses Puffers zusammen. Es wurde für 1 Stunde bei 30 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurde selbst eine einzelne unzutreffende Basenpaarung durch die RNasen erkannt. Anschließend wurden die RNasen durch Zugabe von je 6,6 µl SDS (10 %) und 4,4 µl Proteinase K (10 µg/ml) für 15 min bei 42 °C inaktiviert.

Als Nächstes wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion der RNA durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 300 µl Phenol/Chloroform hinzugefügt und nach 20 s Vortexen dann für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase konnte nun vollständig in neue Eppendorfcups überführt werden. Um später quantitative Aussagen zu ermöglichen, musste gerade bei diesem Arbeitsschritt auf ein exaktes und genaues Arbeiten Wert gelegt werden. Die geschützten doppelsträngigen RNA-Fragmente wurden nun mit 880 µl Ethanol und 1,5 µl tRNA (10 µg/µl) durch 30 min bei -20 °C und anschließend 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm, 4 °C ausgefällt. Danach wurde das Pellet in 25 µl FLB-Puffer (80 % [v/v] deionisiertes Formamid, 1 mM EDTA [pH 8,0], 0,01 % [w/v] TBE [1fach], Bromphenolblau 0,05 % [w/v], Xylencyanol 0,05 % [w/v]) resuspendiert und 5 min auf 95 °C erhitzt.

Es folgte die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA-Fragmente mittels eines Acrylamid/Harnstoff-Gels (5 % Acrylamid/Bisacrylamid [29 : 1], 8 M Harnstoff, 90 mM Trisborat, 2 mM EDTA). Als Größenmarker und Kontrolle dienten 1000 cpm der radioaktiven RNA-Sonde ohne durchgeführten RNase Verdau. Die Elektrophorese (300 V, TBE-Puffer) wurde nach 60 min angehalten, das Gel auf Whatman-Papier fixiert und in einer Gel Trocknungsanlage (Bio Rad) getrocknet.

Die autoradiographische Analyse des Gels erfolgte durch die Exposition einer Phosphorimager-Platte (BAS-MP 2040S, Fuji) für einige Stunden und Auswertung dieser Platte mit Hilfe eines Fuji Phosphorimagers BAS-1500 (Fuji, Straubenhardt, Deutschland).

## 2.5 Western Blot

### 2.5.1 Das Prinzip des Western Blot

Die Methode des Western Blot umfasst die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen, gefolgt von einer spezifischen Detektion des gesuchten Proteins durch Antikörper. Im Vergleich zu einem ELISA erhält man hierbei eine Information über die Molekülmasse des



detektierten Proteins bzw. ob die Antikörper (u. U. unspezifisch) an Proteine unterschiedlicher Molekülmasse binden. In der Regel werden im Western Blot denaturierte Proteine analysiert, während die Proteine beim ELISA in der nativen Form vorliegen. Im Gegensatz zum ELISA erhält man beim Western Blot keine quantitativen Aussagen. Außerdem ist der Zeitaufwand pro Probe erheblich größer.

Mit dem Western Blot kann man sowohl Proben von intrazellulären als auch von sezernierten Proteinen untersuchen. Für das Erstere stellt man aus den Zellen Proteinlysate her. Für das zweite Vorhaben können die in die Zellkulturüberstände sezernierten Proteine präzipitiert werden.

Um beim Western Blot von Proteinlysaten leichter semiquantitative Aussagen treffen zu können, wird in den einzelnen Proben eines Experiments im Rahmen der Herstellung der Proteinlysate die Gesamtproteinkonzentration bestimmt. Anhand dieser Messung wird für jede Probe die gleiche Menge Gesamtprotein für den Western Blot verwendet, so dass Unterschiede in der Bandenstärke des immunchemisch detektierten Proteins nicht auf eine zwischen den einzelnen Proben insgesamt ungleiche Beladung mit Proteinen zurückzuführen sind.

Durch die bei dieser Promotionsarbeit angewendete saure Präzipitation von Zellkulturüberständen ist eine starke Ankonzentrierung der Proteine erreichbar. Deshalb müssen die Experimente in serumfreiem Nährmedium ohne Anwesenheit von Serumproteinen aus FCS durchgeführt werden.

Die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches erfolgt nach dem Molekularsiebeffekt mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Proteine sollen einzig und alleine nach ihrem Molekulargewicht (in kDa) und nicht nach ihrer nativen Konformation oder physiologischen Ladung aufgetrennt werden. Deshalb werden sie vorher einige Minuten nahe dem Siedepunkt von Wasser, unter Anwesenheit eines Detergenz welches Disulfidbrücken aufspaltet, denaturiert. Eine einheitliche Ladung wird durch das negativ geladene ionische Detergenz SDS erreicht, welches sich in dem konstanten Verhältnis von 1 SDS-Molekül pro 2 Aminosäurereste des Proteins anlagert und so die Eigenladung des Proteins maskiert. Die Proteine stellen also quasi lange Fäden mit einer zu ihrer Länge proportionalen Ladung dar.

Das Polyacrylamid-Gel bildet ein molekulares Maschenwerk durch das die fadenförmigen Proteine beim Anlegen einer Spannung wandern, wobei lange Fäden langsamer durch die Maschen vorankommen als kurze Fäden und so letztlich eine Auftrennung nach der Proteinmasse erfolgt. Die Maschengröße im Gel wird maßgeblich durch die Konzentration (in %) an Acrylamid bestimmt, welche je nach Molekulargewicht des gesuchten Proteins gewählt wird. Die Abschätzung der Molekülmassen kann später anhand eines Größenmarkers geschehen. Im Detail ist dem Trenngel noch ein Sammelgel mit anderem pH-Wert vorgelagert. Durch diese Anordnung wird eine „Ankonzentrierung“ der Probe am Phasenübergang zwischen beiden Gelen mit einer anschließend exakteren Auftrennung und hohen Bandenschärfe erreicht.

Die im Gel aufgetrennten Proteine lassen sich auf eine Membran aus z. B. PVDF (oder Nitrocellulose) transferieren. Bei diesem als „Blotten“ bezeichneten Arbeitsschritt wird ein

„Sandwich“ aus Gel plus Membran zwischen in Pufferlösung getränktem Filterpapier und zwei Elektroden angeordnet. Der Transfer bei diesem „Elektroblotting“ erfolgt durch Anlegen eines senkrecht zur ersten Auftrennungsebene gerichteten elektrischen Feldes.

Die Qualität und Effizienz der Gelelektrophorese und des Blottens können parallel zum weiteren Vorgehen durch eine anschließende Färbung des Gels mit dem Farbstoff Coomassie abgeschätzt werden.

Nach dem Blotten wird die Membran mit der Antikörperverschüttung gegen das gesuchte Protein inkubiert, nachdem unspezifische Bindungsstellen durch eine Milchpulverlösung geblockt worden sind. Anschließend wird der ungebundene Antikörperüberschuss mit einer Pufferlösung gründlich gewaschen und mit einem gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichteten Zweitantikörper inkubiert. Der Überschuss an diesem mit dem Enzym Peroxidase konjugierten sekundären Antikörper wird wiederum gewaschen. Die Visualisierung des gesuchten Proteins erfolgt, indem eine Substratlösung für die Peroxidase auf die Membran gebracht wird, so dass eine lumineszierende Reaktion an den Stellen, wo die Antikörper gebunden haben, katalysiert wird. Die Lumineszenz wird in Dunkelheit mit Hilfe von Photo-filmen detektiert und dokumentiert.

Am Ende kann eine unselektive und weit weniger sensitive Anfärbung aller Proteine auf der Membran mit dem Farbstoff Ponceau S durchgeführt werden. Anhand dessen kann die Effizienz des Proteintransfers und vor allem die Gleichmäßigkeit der Gesamtproteinmengen in allen Proben abgeschätzt werden.

### 2.5.2 Herstellung von Proteinlysaten für den Western Blot

Der Lysispuffer setzte sich aus 300 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7,6), 0,5 % Triton X-100 und einem Protease-Inhibitor-Mix (1fach) (Boehringer Mannheim, Mannheim) zusammen.

Zur Beendigung der in 6-Well-Gewebekulturplatten durchgeführten Experimente wurde der (Nährmedium-) Überstand abgenommen bzw. abgesaugt. Die Wells wurden 2-mal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 300 µl Lysispuffer pro Well wurden die Gewebekulturplatten 30 min auf Eis aufbewahrt und zwischendurch geschwenkt, um eine komplette Benetzung der Oberfläche der Wells zu gewährleisten. Nun wurden die lysierten Zellbestandteile mit Hilfe eines sterilen Zellschabers gründlich von der Oberfläche abgelöst und der Inhalt der Wells in autoklavierte Eppendorfcups pipettiert. Während der anschließenden Arbeitsschritte wurden die Proben immer auf Eis gelagert. Es folgte die Abtrennung von ungelösten Bestandteilen durch 20 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C (Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Hanau). Jeweils 200 µl aus dem gebildeten Überstand wurden in neue autoklavierte Eppendorfcups überführt.

Für die Lagerung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei mindestens –20 °C aufbewahrt.

Zur Messung der Gesamtproteinkonzentration in den Proben wurde ein Protein Assay (Roti®-Nanoquant, Roth, Karlsruhe) in 96-Well-Platten durchgeführt. Dabei wurde eine Verdünnung der

Proben zusammen mit einer Standardverdünnungsreihe von BSA (100 – 20 µg/ml) aufgetragen und die Nachweislösung des Protein Assay hinzugefügt. Im Einzelnen richteten sich die Arbeitsschritte nach den Anweisungen des Herstellers.

Am Ende wurde photometrisch die OD mit einem ELISA-Reader (Microplate Reader, BioRad) gemessen und computergestützt (Microplate Manager™, Version 4.0, BioRad) ausgewertet.

Ausgehend von dem Protein Assay wurde jeweils ein Volumen mit einer für alle Proben gleichen Menge an Gesamtprotein (je nach Experiment 20 – 60 µg) in Eppendorfcups pipettiert. Die Proben wurden mit ¼ Volumen eines 4fach Ladepuffers (Roti®-Load1, Roth, Karlsruhe, enthält u. a. denaturierende, reduzierende Agenzien) versetzt, 5 min bei 99 °C denaturiert und anschließend direkt für die Gelelektrophorese verwendet.

### 2.5.3 Präzipitation von Zellkulturüberständen für den Western Blot

Die von Zellen sezernierten Proteine können mit Hilfe einer Präzipitation durch Trichloressigsäure aus den Überständen gefällt und anschließend im Western Blot nachgewiesen werden. Ein Vorteil der Präzipitation ist die Ankonzentrierung der Proteine, die sich vor der Fällung in einigen Millilitern Überstand befinden und nach der Fällung nur noch in einige Mikroliter Ladepuffer aufgenommen werden.

Die Experimente wurden auf 10-cm-Gewebekulturschalen in serumfreiem Medium durchgeführt (siehe unter 2.1.1).

Das Protokoll der Präzipitation umfasste folgende Schritte:

1. Das Experiment wurde durch das Abnehmen der Überstände in autoklavierte Eppendorfcups beendet, wobei die 5 ml Überstand einer Gewebekulturschale auf 4 Eppendorfcups verteilt wurden, mit denen im Folgenden simultan weitergearbeitet wurde.
2. Etwaig vorhandene Zellbestandteile wurden von den Überständen durch 5 min Zentrifugieren bei 2500 rpm, 4 °C abgetrennt und die Überstände in neue Eppendorfcups überführt.
3. 70%ige Trichloressigsäure (TCA) wurde im Volumenverhältnis von 1 : 10 zu den Überständen hinzugefügt. Es wurde 1 min durch Invertieren der Eppendorfcups gemischt und dann 30 min auf Eis stehen gelassen.
4. Das Präzipitieren der Proteine wurde durch 30 min Zentrifugieren bei 13000 rpm, 4 °C unterstützt.
5. Anschließend wurden die Überstände entfernt. Die präzipitierten Proteine wurden mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen und 5 min bei 13000 rpm, 4 °C zentrifugiert.
6. Das Aceton wurde sorgfältig abpipettiert.
7. In die Eppendorfcups wurden 10 µl 2fach konzentrierter Ladepuffer (Roti®-Load1, Roth, Karlsruhe) hinzupipettiert und 5 min bei 99 °C denaturiert. Der Inhalt der jeweils 4 zusammengehörigen Eppendorfcups wurde vereinigt.
8. Die Proben wurden entweder direkt für die Gelelektrophorese aufgetragen oder bis dahin bei mindestens –20 °C gelagert. Im letzteren Fall erfolgte vor dem Auftragen nochmals ein Denaturierungsschritt durch 2 min bei 99 °C.

### 2.5.4 Gelelektrophorese, Blotten und Immundetektion

#### Schritt 1: SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Die Glasplatten der Gelapparatur (entweder Hoefer Scientific Instruments oder BioRad) sowie die dazugehörigen Spacer und Kämme wurden gründlich mit Wasser plus Seife und anschließend Ethanol von Fettresten gereinigt. Nach dem Trocknen der Teile erfolgte der Zusammenbau der Gelkammer und ihre vertikale Positionierung in der Gießvorrichtung. Nun konnte die Trenngellösung vorbereitet werden, wobei je nach Größe des gesuchten Proteins der Anteil an Acrylamid variiert wurde. Das Trenngel setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen (pro Gel):

Reagenz	Acrylamid-Endkonzentration	
	10 %	12 %
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	5,0 ml	6,0 ml
4fach Tris/HCl / SDS (pH 8,8)	3,75 ml	3,75 ml
ddH <sub>2</sub> O	6,25 ml	5,25 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,07 ml	0,07 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

Das Ammoniumpersulfat als Polymerisationsstarter wurde zuletzt hinzugefügt, die Lösung gut durchmischt und unverzüglich die Gelkammer zu  $\frac{3}{4}$  mit der Lösung gefüllt. Sofort wurde mit ddH<sub>2</sub>O überschichtet, um eine glatte blasenfreie Gelgrenze zu erreichen. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels (nach circa 30 – 45 min) konnte das ddH<sub>2</sub>O wieder abgegossen werden. Das Sammelgel wurde vorbereitet und enthielt folgende Komponenten:

Reagenz	pro Gel
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	0,65 ml
4fach Tris/HCl / SDS (pH 6,8)	1,25 ml
ddH <sub>2</sub> O	3,05 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,035 ml
TEMED	0,005 ml

Nach dem Mischen der Sammelgellösung wurde das Trenngel überschichtet und das Sammelgel mit einem Kamm zur Schaffung der Geltaschen versehen. Nach dem Erstarren des Sammelgels konnte die Gelkammer in die Elektrophoreseeinrichtung eingespannt werden. Die Reservoirs der Elektrophoreseeinrichtung wurden mit SDS-Elektrophoresepuffer (15,1 g Tris Base, 72,0 g Glycin, 5,0 g SDS mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt und diese Stammlösung vor Gebrauch 1 : 5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt) gefüllt. Der Kamm konnte vorsichtig entfernt und die kurz

vorher denaturierten Proben (siehe 2.5.2 und 2.5.3) in die Geltaschen aufgetragen werden. Das Volumen der aufgetragenen Proben lag zwischen 15 µl und 40 µl. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Molekulargewichtsmarker (Broad Range, BioRad und ggf. Rainbow, Amersham Life Science) aufgetragen, um eine spätere Größenordnung der aufgetrennten Proteine zu ermöglichen. Die Elektrophoreseeinrichtung wurde an die Spannungsquelle (15 mA pro Gel, 300 V; Electrophoresis Power Supply EPS 600, Pharmacia Biotech) und an eine Wasserkühlung angeschlossen. Die Elektrophorese wurde nach 1,5 – 2 h beendet, wenn die blaue Lauffront des Ladepuffers das untere Ende der Gelkammer erreicht hatte.

### **Schritt 2: Blotten**

Das Gel wurde aus der Elektrophoreseeinrichtung entnommen, das Sammelgel verworfen und eine Ecke des Trenngels markiert, damit seine Orientierung später nicht vertauscht werden konnte. Anschließend wurde das Gel für einige Minuten in ein Gefäß mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20 % Methanol [pH 8,3]) gelegt.

In der Zwischenzeit wurde eine Membran für den Proteintransfer vorbereitet, indem sie auf die Größe des Gels zugeschnitten und ebenfalls an einer Ecke markiert wurde. Es handelte sich um Membranen aus PVDF (Polyvinylidendifluorid, Immobilon™-P, Sigma), die vor dem Transfer aktiviert werden mussten. Dazu wurde die Membran 15 s in ein Gefäß mit Isopropanol gelegt und anschließend schnell und gleichmäßig für 2 min in ein Gefäß mit ddH<sub>2</sub>O getaucht. Um den pH-Wert zu equilibrieren, wurde die Membran dann für ein paar Minuten in ein Gefäß mit Transferpuffer überführt. Das verwendete Blotting-Papier (Sigma) wurde ebenso mit Transferpuffer getränkt. Der Aufbau der Blotting-Apparatur erfolgte, indem auf die Bodenplatte (Anode) 3 Lagen Blotting-Papier, darauf die PVDF-Membran, dann das Trenngel und darüber wiederum 3 Lagen Blotting-Papier geschichtet wurden. Es wurde darauf geachtet, dass zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen vorhanden waren. Solche wurden durch vorsichtiges Rollen mit einem Glasstab beseitigt. Nachdem die Deckelplatte (Kathode) positioniert und mit einem Gewicht beschwert war, wurde die Spannungsquelle mit den Einstellungen 60 mA pro Gel, 50 V und einer Laufzeit von 1,5 h angeschlossen.

### **Schritt 3: Coomassie Färbung**

Eine unspezifische Detektion der Proteine in dem Acrylamidgel ließ sich durch Färbung mit Coomassieblau-Lösung (0,1 % R250, 50 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) erreichen. Die Färbung wurde nach dem Blotten durchgeführt, da sich in aller Regel auch nach dem Transfer noch ein Teil der Proteine im Gel befindet. So kann man einerseits die elektrophoretische Auftrennung der Proteine, den Umfang ihres Transfers wie auch eventuelle Unterschiede zwischen den Proteinmengen in den einzelnen Spuren / Proben sichtbar machen. Die Gele wurden meistens über Nacht mit der Färbelösung auf einer Wippschwenkapparatur inkubiert und anschließend mit einer Entfärbelösung (50 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) soweit entfärbt, dass die Proteinbanden sichtbar waren.

Zur Dokumentation war das Einscannen per Computer möglich.

### Schritt 4: Immundetektion

Nach dem Abbau der Blotting-Apparatur wurde die PVDF-Membran für 1 Stunde mit einer Lösung aus TBST (100 mM Tris/HCl [pH 7,5], 0,9 % NaCl, 0,1 % Tween 20) plus 10 % Trockenmilchpulver auf einer Wippschwenkapparatur inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen für Antikörper auf der Membran abgeblockt. Es wurde eine Verdünnung (siehe 2.5.5 und 2.5.6) des Erstantikörpers in TBST plus 10 % Trockenmilchpulver hergestellt und die Membran je nach Größe mit z. B. 6 ml dieser Lösung in einer Kunststoffolie luftblasenfrei eingeschweißt. Aufgeklebt auf eine Drehschwenkapparatur, folgte über Nacht die Inkubation bei 4 °C. Die Lösung mit dem Erstantikörper konnte anschließend aufbewahrt und mehrmals hintereinander benutzt werden. Um die Membran von unspezifisch anhaftenden Antikörpermolekülen zu befreien, wurde sie 4-mal hintereinander jeweils für 10 min in einem Gefäß mit TBST auf einer Wippschwenkapparatur gewaschen. Der Zweitantikörper wurde wiederum in TBST plus 10 % Trockenmilchpulver verdünnt und die Membran für 1,5 h mit ihm inkubiert. Im Anschluss wurde erneut 4-mal je 10 min mit TBST gewaschen.

Nachfolgend wurden in der Dunkelkammer die spezifisch gebundenen Antikörper mit Hilfe eines Chemolumineszenz Kits (ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) detektiert. Das Kit beinhaltet zwei Komponenten für die Lumineszenzreaktion, welche durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert wurde. Die beiden Lösungen des Kit wurden kurz vorher im Verhältnis 1 : 1 gemischt und die Membran mit 2 ml gleichmäßig vollständig benetzt. Nach 1 min Inkubation wurde in Dunkelheit ein Photofilm (Hyperfilm™, Amersham) aufgelegt. Die Belichtungszeit betrug je nach Signalstärke bis zu 20 min. Der Film wurde sofort entwickelt (Entwicklermaschine: Hyperprocessor™, Amersham) und gegebenenfalls weitere Filme mit anderen Zeiten belichtet. Dabei war zu beachten, dass die Lumineszenzreaktion natürlich unmittelbar nach dem Aufbringen der Substratlösung am stärksten abläuft und dann kontinuierlich schwächer wird.

Die belichteten Filme konnten zur Dokumentation mit Hilfe eines Softwareprogramms (Molecular Analyst® Software, Version 1.5, BioRad) eingescannt und als Bilddatei gespeichert werden.

### Schritt 5: Ponceau S Färbung und Größenbestimmung der Proteine

Zusätzlich zu der spezifischen Immundetektion des gesuchten Proteins bietet die anschließende Färbung der Membran mit Ponceau S eine einfache Methode zur Darstellung der Gesamtproteinmenge auf den einzelnen Spuren der Membran. Außerdem wird natürlich auch der Molekulargewichtsmarker (Broad Range, BioRad) angefärbt.

Zuerst wurde die Membran für circa 0,5 – 1 h mit der Ponceau S Färbelösung auf einer Wippschüttelapparatur inkubiert und dann mit H<sub>2</sub>O bis zum deutlichen Sichtbarwerden der Proteinbanden entfärbt. Die Membranen wurden getrocknet, eingescannt und als Bilddatei abgespeichert.

### 2.5.5 Interleukin-18 Western Blot

Die Detektion von IL-18 mittels Western Blot erfolgte in Proteinlysaten (siehe 2.5.2). Entsprechend des Molekulargewichts von IL-18, welches 24 kDa für proIL-18 bzw. 18 kDa für reifes IL-18 beträgt, wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem Acrylamidanteil von 12 % durchgeführt. Als Erstantikörper gegen IL-18 dienten polyklonale Antikörper vom Kaninchen (Pepro Tech Inc., Frankfurt). Diese Erstantikörperlösung wurde in der Verdünnung 1 : 2000 verwendet.

Der mit Meerrettich-Peroxidase markierte „anti-rabbit“ Zweitantikörper stammte von der Firma BioRad (München) und wurde 1 : 10000 verdünnt.

Als positive Kontrollen dienten rekombinantes humanes reifes IL-18 (Pepro Tech Inc.) und rekombinantes humanes proIL-18 (freundlicherweise überlassen von R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt).

Die Belichtungszeiten der Photofilme lagen bei 1 – 15 min.

### 2.5.6 Etablierung eines Interleukin-18-Bindungsprotein Western Blot

Die Etablierung eines Western Blot für den Nachweis von IL-18BP unterlag dem Hindernis, dass zu Beginn dieser Promotionsarbeit noch keinerlei kommerziell erwerbliche Antikörper gegen IL-18BP verfügbar waren. Auch (rekombinantes) IL-18BP war nicht käuflich erhältlich.

Aus diesem Grund wurde eine Biotechnologie Firma (Eurogentec, Seraing, Belgien) mit der Herstellung von polyklonalen Antiseren beauftragt. Dabei wurde ein Peptid mit einer identischen Aminosäuresequenz zu einem spezifischen Bereich des IL-18BP synthetisiert und damit dann Kaninchen immunisiert. Die Sequenz des Peptids entsprach dem C-terminalen Ende der humanen Isoform IL-18BP<sub>a</sub> [191, 192] und lautete: TQEALPSSHSPQQQG.

Diese Aminosäurenabfolge ist nicht in den anderen Isoformen von IL-18BP vorhanden.

Mit den Antiseren als Erstantikörper wurde zuerst der Nachweis von IL-18BP in Proteinlysaten versucht. Leider war weder sicher, ob in den Proteinlysaten der Experimente wirklich IL-18BP enthalten war, noch ob die Antiseren funktionstüchtig waren. Letzteres konnte aufgrund des (anfänglichen) Fehlens einer positiven Kontrolle auch nicht überprüft werden.

Um trotzdem mit ausreichender Sicherheit sagen zu können, dass es sich bei einer mit dem Antiserum detektierten Bande wirklich um IL-18BP handelte, konnten folgende Überlegungen herangezogen werden:

- a) Die Bande musste in der zutreffenden Molekulargröße von IL-18BP, also bei 40 – 50 kDa, liegen.
- b) Die Bande sollte mit dem Antiserum, d. h. nach Immunisation der Kaninchens, nicht aber mit Serum des gleichen Kaninchens vor der Immunisation detektierbar sein.
- c) Die Bande sollte durch Interferon- $\gamma$  induzierbar sein (siehe zum Verständnis im Ergebnisteil).

Da der Nachweis von IL-18BP in Proteinlysaten nicht erfolgreich war, wurden Präzipitate von Zellüberständen (siehe 2.5.3) für die Western Blots verwendet. Dafür wurde auf serumfreies Nährmedium ohne FCS gewechselt, welches deutlich weniger Gesamtprotein enthält.

Schließlich gelang unter serumfreien Bedingungen mit den Antiseren die Detektion einer Interferon- $\gamma$  induzierten Bande in der für IL-18BP zutreffenden Molekulargröße. Diese Bande war nicht mit den Preimmunseren der Kaninchen nachweisbar, die vom Zeitpunkt vor der Immunisation der Tiere gegen das Peptid von IL-18BP stammten.

Eine eingehende Untersuchung der Eigenschaften der Antiseren wurde von Jens Paulukat vorgenommen. Unter anderem wurde durch transiente Transfektion IL-18BP $\alpha$  exprimiert und somit eine positive Kontrolle bereitgestellt. Anhand dieser Kontrolle ließen sich die Antiseren als spezifisch für IL-18BP $\alpha$  charakterisieren.

Für das Antiserum wurde eine Verdünnung von 1 : 1000 und für den mit Meerrettich-Peroxidase markierten „anti-rabbit“ Zweitantikörper (BioRad, München) eine Verdünnung von 1 : 20000 etabliert.

Bei der PAGE wurden Gele mit einem Acrylamidanteil von 10 % verwendet.

Die Belichtungszeiten der Photofilme lagen in der Regel bei 1 – 3 min.

## 2.6 Statistik

Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte durch den t-Test für unverbundene Stichproben mit Hilfe des Computer Programms SigmaPlot 4.0 (Jandel Scientific, San Rafael, USA). Bei einem  $P < 0,05$  wurden die Unterschiede als signifikant gewertet.

Die in Abbildungen verwendeten Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

## 2.7 Reagenzien

Zusätzlich zu den bisher genannten Materialien wurden folgende weitere Reagenzien verwendet:

Reagenz	Hersteller
Interferon- $\gamma$	PeproTech. Inc. (Frankfurt, Deutschland), 5 ng/ml entsprachen laut Angaben des Herstellers mindestens 100 U/ml
Lipopolysaccharid (026B6)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
IL-12	R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
proIL-18	R&D Systems



## 2 Material und Methoden

IL-18	PeproTech. Inc.
Dexamethason	Calbiochem-Novabiochem GmbH (Bad Soden, Deutschland)
IL-1 $\beta$	Cell Concepts (Umkirch, Deutschland)
TNF $\alpha$	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Knoll AG
TGF $\beta_2$	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. N. Cerletti (Novartis, Basel, Schweiz)
LIF	R&D Systems
IL-4	PeproTech. Inc.
Anti-Fas-Antikörper (DX2)	Pharmingen (Hamburg, Deutschland)
Anti-Interferon- $\gamma$ -Antikörper	Pharmingen
Kontroll-Antikörper	Pharmingen
Histamin	Calbiochem-Novabiochem GmbH
SB203580	Calbiochem-Novabiochem GmbH
dBcAMP	Calbiochem-Novabiochem GmbH oder Sigma
Zink (-chlorid)	MEDICE (Iserlohn, Deutschland)
Spermin	Calbiochem-Novabiochem GmbH
Genistein	Calbiochem-Novabiochem GmbH
ATRA	Sigma

## 2.8 Computer Software

Textverarbeitung	Microsoft Word 2000 EndNote 6.0 Adobe Acrobat 6.0
Bildbearbeitung	Corel Draw 8.0
Literaturrecherche	PubMed ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed</a> ) ISI Web of Science ( <a href="http://elib.tu-darmstadt.de/WoS/">http://elib.tu-darmstadt.de/WoS/</a> )
DNA/Protein Homologie Suche	BLAST ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a> )
Statistik	SigmaPlot 4.0

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Expression von Interleukin-18-Bindungsprotein auf mRNA-Ebene

##### 3.1.1 Nachweis einer konstitutiven Expression von mRNA für Interleukin-18-Bindungsprotein in verschiedenen Zelltypen

Bislang waren von zwei anderen Arbeitsgruppen eine Reihe von Organextrakten auf eine konstitutive Expression der IL-18BP mRNA untersucht worden [191, 192]. Allerdings gab es noch keine Untersuchungen darüber, in welchen konkreten humanen Zelltypen die konstitutive Transkription des IL-18BP Gens stattfindet. Deshalb sollte zuerst eine kleine Auswahl von Nicht-Immunzellen, die jeweils separat in Zellkultur gehalten wurden, mittels RT-PCR untersucht werden.

Es war bereits beschrieben worden, dass im normalen humanen Kolon eine Expression der IL-18BP mRNA nachzuweisen ist [191]. Im Einklang damit, zeigt sich auch bei der epithelialen Kolonkarzinom-Zelllinie DLD-1 eine – wenn auch schwache – Bande der IL-18BP mRNA nach 32 Zyklen RT-PCR bei 1 µg Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial (Abb. 3.1A). Obwohl diese konstitutive Expression als vergleichsweise moderat eingeschätzt werden kann, so war sie doch absolut reproduzierbar bei insgesamt 13 unabhängigen Experimenten, die über einen Zeitraum von vielen Monaten durchgeführt wurden, vorhanden. Natürlich sind diese Ergebnisse von DLD-1 Zellen nicht direkt mit den Eigenschaften des benignen Kolonepithels gleichzusetzen. Dennoch deuten sie darauf hin, dass wahrscheinlich die Epithelschicht des Kolons einen Beitrag an der, für das normale Kolon beschriebenen, IL-18BP Expression leisten kann.

Der Sachverhalt, dass es sich bei IL-18BP um ein konstitutiv freigesetztes Protein handelt, wird dadurch bekräftigt, dass seine Isolation aus normalem menschlichen Urin möglich war [191]. Insgesamt unbeantwortet blieb aber die Frage, welcher Anteil des im Urin vorhandenen IL-18BP systemischen bzw. direkt renalen Ursprungs ist. Jedenfalls gehört die Niere zu den Organen mit einer gegenüber z. B. der Milz oder Lunge vielfach niedrigeren konstitutiven mRNA Expression von IL-18BP [192]. Nichtsdestotrotz sollten die Untersuchungen dieser Promotionsarbeit auf humane Mesangiumzellen ausgedehnt werden.

Diese glomerulären renalen Zellen stellen einen Typ hochspezialisierter Perizyten mesenchymalen Ursprungs dar und teilen viele Eigenschaften von glatten Gefäßmuskelzellen sowie Makrophagen [212, 213, 213a]. Mesangiumzellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Kontraktion an der Regulation der glomerulären Durchblutung und Filtration mitbeteiligt [213a, 214]. Andererseits sind sie zur Phagozytose fähig und orchestrieren Entzündungsvorgänge wie sie im Rahmen einer Glomerulonephritis ablaufen. Bewerkstelligt wird dies u. U. durch eine erhöhte Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Stickstoffmonoxid, Prostaglandinen, Zytokinen, Chemokinen, der Expression von Adhäsionsmolekülen, der gesteigerten Synthese

### 3 Ergebnisse

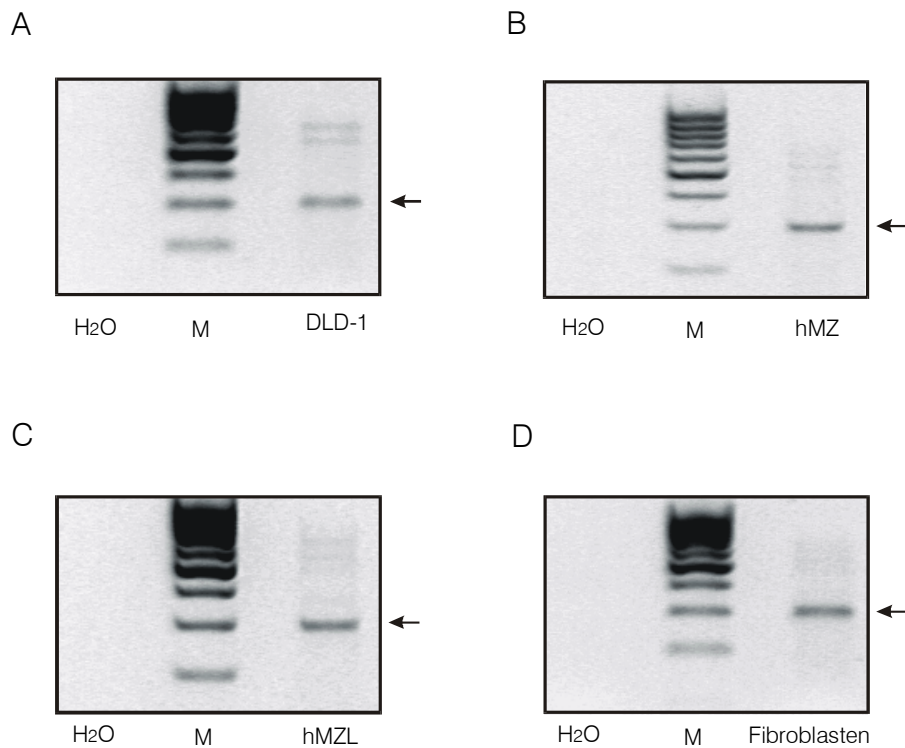


Abb. 3.1: Konstitutiver Nachweis der mRNA für IL-18BP in Nicht-Immunzellen. Detektion einer schwachen Bande in allen 4 Zelltypen mittels RT-PCR (32 - 35 Zyklen). Die freie Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) beweist die Abwesenheit von Kontaminationen. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von jeweils mehreren unabhängigen Experimenten. (A) DLD-1 Kolonkarzinomzellen (n = 13). (B) Primäre humane Mesangiumzellen (n = 4). (C) Humane Mesangium-Zelllinie (n = 2). (D) Primäre humane Fibroblasten (n = 4). M= Marker.

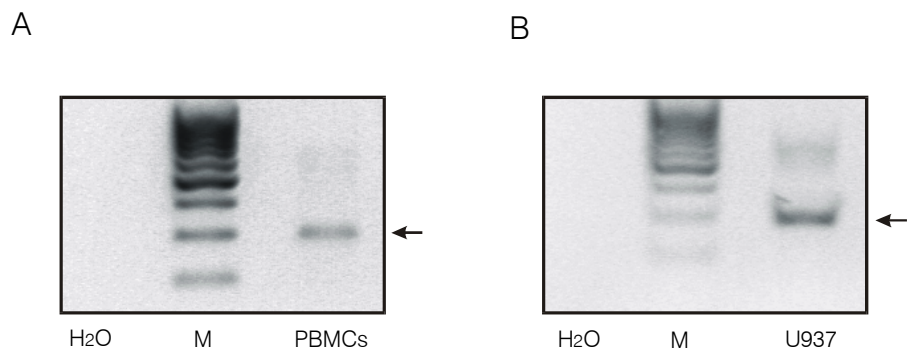


Abb. 3.2: Nachweis einer schwachen konstitutiven mRNA für IL-18BP in Immunzellen durch RT-PCR (33 Zyklen). (A) Humane PBMCs (n = 2). (B) Humane U937 Monozyten-Zelllinie (n = 3). M = Marker. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle.

von Komponenten der extrazellulären Matrix und durch eine gesteigerte mesangiale Zellproliferation [215-218].

Tatsächlich lässt sich in primären humanen Mesangiumzellen analog zu den Ergebnissen in DLD-1 Zellen eine schwache konstitutive mRNA für IL-18BP<sub>a</sub> detektieren (Abb. 3.1B). Diese Expression war gleichsam in einer durch Transfektion mit SV40 immortalisierten Mesangium-Zelllinie zu beobachten (Abb. 3.1C), welche sich durch eine im Vergleich zu den primären Mesangiumzellen deutlich schnelleren Proliferation auszeichnet. Anhand dieses Beispiels zeigt sich somit keine unmittelbare qualitative Beeinflussung der konstitutiven Expression von IL-18BP<sub>a</sub> durch die Geschwindigkeit des Zellzyklus.

Als vierter Nicht-Immun-Zelltyp waren primäre humane Fibroblasten Gegenstand der Untersuchungen. Fibroblasten sind typische ortsständige Bindegewebszellen von ubiquitärem Vorkommen im Organismus. Interessanterweise exprimieren auch diese Zellen die IL-18BP<sub>a</sub> mRNA konstitutiv (Abb. 3.1D).

Da das konstitutive Vorhandensein der IL-18BP<sub>a</sub> mRNA ein allgemeingültiger Sachverhalt in den untersuchten ortsständigen Zelltypen zu sein scheint, lag die Frage nicht fern, ob Gleiches auch für Immunzellen zutrifft. Deshalb wurden PBMCs aus dem Blut von gesunden Donoren isoliert. Bei PBMCs handelt es sich um eine gemischte Population von Leukozyten, bei der T-Lymphozyten mit 70 – 80 % den Hauptanteil ausmachen [26]. Daneben sind mit 10 – 30 % Monozyten vertreten und in geringerem Maße NK-Zellen und Basophile. Auch in PBMCs lässt sich mittels RT-PCR eine konstitutive Expression des IL-18BP<sub>a</sub> Gens belegen (Abb. 3.2A). Darüber hinaus ist in der Monozyten-Zelllinie U937 ebenfalls die Detektion der mRNA für IL-18BP<sub>a</sub> möglich (Abb. 3.2B). Weiterhin konnte bei RNA aus dendritischen Zellen das gleiche Resultat beobachtet werden (Daten nicht abgebildet).

In Zusammenfassung kann festgehalten werden, dass in allen untersuchten Zellen eine schwache konstitutive Expression der Isoform a von IL-18BP stattfindet. Mit der durchgeführten RT-PCR sind lediglich semiquantitative Aussagen zulässig und es ist anzumerken, dass die Zyklenzahl und die eingesetzte Menge an Gesamt-RNA geringfügig variierte. Ein quantitativer Vergleich der Zelltypen bezüglich ihrer Expression von IL-18BP war nicht angestrebt. Die erzielten Ergebnisse sprechen jedoch für eine ubiquitäre Expression von IL-18BP, der wie wahrscheinlich anzunehmen ist konsequent auch eine kontinuierliche Freisetzung basaler Mengen des IL-18BP<sub>a</sub> Proteins folgt.

#### 3.1.2 Interferon- $\gamma$ induziert einen Anstieg an Interleukin-18-Bindungsprotein mRNA in mehreren Zelltypen

Nachdem in den ersten Experimenten die konstitutive Genexpression von IL-18BP belegt werden konnte, galt es daraufhin die Fragestellung zu bearbeiten, ob das Gen von IL-18BP durch andere Faktoren induzierbar ist.

Die biologische Funktion von IL-18BP ist die Neutralisation von IL-18. Deshalb wurden Überlegungen über die Stellung von IL-18 in der Immunabwehr und im *Cytokine Network* angestellt, anhand derer eine Auswahl möglicher Faktoren mit Einfluss auf die IL-18BP

### 3 Ergebnisse

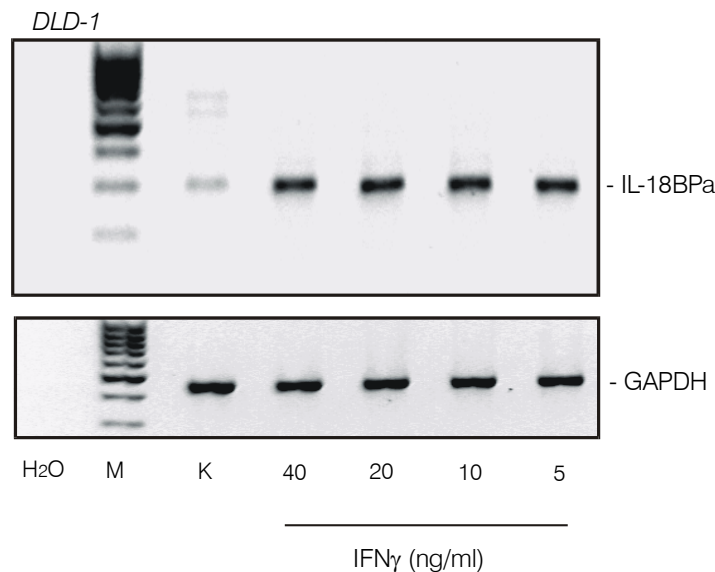


Abb. 3.3: Induktion der IL-18BPα mRNA durch Interferon-γ in der Kolonkarzinom-Zelllinie DLD-1. Die Zellen wurden für 21 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Interferon-γ stimuliert. Es folgte die Detektion der IL-18BPα mRNA mittels RT-PCR. Um semiquantitative Aussagen zuzulassen, wurde parallel eine RT-PCR für GAPDH durchgeführt (unterer Bildteil). Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten (n = 3). IFNγ = Interferon-γ. K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker.

Genexpression getroffen werden sollte. Da als wichtigste Aufgabe von IL-18 die Veranlassung der Interferon-γ Freisetzung zu nennen ist, lag die Hypothese auf der Hand, dass Interferon-γ seinerseits eine Wirkung bezüglich IL-18BP ausüben könnte.

Zur Testung dieser Hypothese wurden DLD-1 Kolonkarzinomzellen kultiviert und auf 6-Well-Platten ausgesät. Als die Zellen konfluent waren, wurden sie entweder als Kontrollzellen gehalten oder mit verschiedenen Interferon-γ Konzentrationen stimuliert. Nach 21 Stunden wurden die Experimente beendet, indem aus den Zellen die Gesamt-RNA isoliert wurde. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend mit spezifischen Primern PCRs für IL-18BP und GAPDH durchgeführt. Die Zyklenzahlen der PCRs betrug dabei 32 für IL-18BP und 23 für GAPDH, bei 1 µg Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial.

Als Ergebnis dieser Experimente ließ sich demonstrieren, dass durch die Stimulation mit Interferon-γ die mRNA von IL-18BPα in den DLD-1 Zellen stark hochreguliert wird (Abb. 3.3). Dieser Effekt war bei sämtlichen verwendeten Interferon-γ Konzentrationen (5 – 40 ng/ml) in gleicher Weise zu beobachten. Durch Interferon-γ erfolgten keine Veränderungen in den Spiegeln der mRNA für das „housekeeping gene“ GAPDH. Die induzierende Wirkung von Interferon-γ auf die mRNA von IL-18BPα trat dagegen reproduzierbar bei vielfacher Wiederholung der Experimente auf.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde dennoch neben der RT-PCR Methode mit der restlichen Gesamt-RNA aus denselben Experimenten RNase Protection Assays durchgeführt. Dabei war ebenfalls eine immense Induktion der IL-18BPα mRNA durch Interferon-γ evident (Abb. 3.4). Anhand der Autoradiographien der Gele wurde eine Quantifizierung des relativen

### 3 Ergebnisse

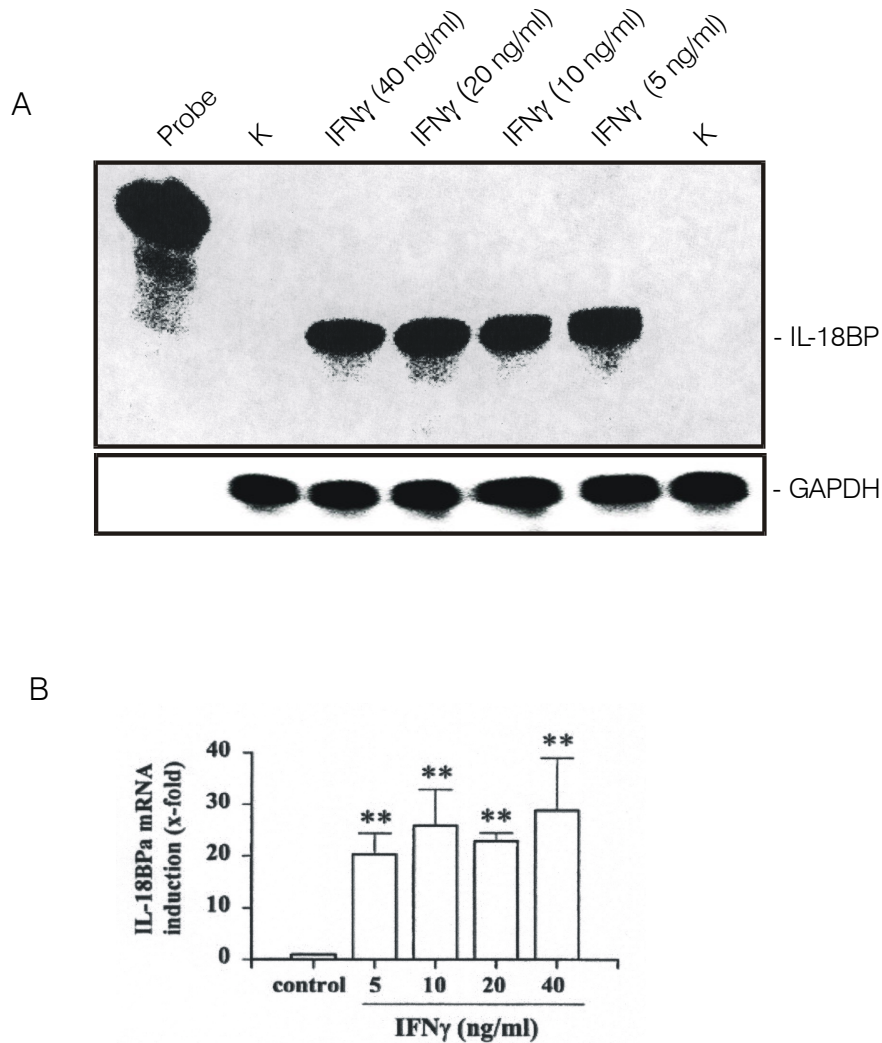


Abb. 3.4: RNase Protection Assay zum Nachweis der Induktion von IL-18BP mRNA durch Interferon- $\gamma$  in DLD-1 Zellen.

(A) Die Zellen wurden für 21 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Interferon- $\gamma$  zusammengebracht, die Gesamt-RNA isoliert und mit einer radioaktiven Antisense-RNA gegen IL-18BP mRNA detektiert. Es handelte sich um dieselben Experimente von denen auch eine RT-PCR durchgeführt wurde (siehe Abb. 3.3). K = unstimulierte Kontrollzellen. Probe = RNA-Sonde ohne durchgeführten RNase Verdau. (B) Der Anstieg der IL-18BP mRNA wurde durch Analyse der autoradiographischen Gele mit einem Phosphorimager (Fuji) beurteilt. Es sind die relativen Vervielfachungen der mRNA im Vergleich zu unstimulierten Kontrollbedingungen abgebildet (n = 3). \*\*P < 0,01. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Anstiegs der mRNA in den Protection Assays vorgenommen. Während der konstitutive Gehalt an IL-18BP mRNA nur gering war, fanden durch Interferon- $\gamma$  signifikante Vermehrungen der mRNA auf durchschnittlich den 20 – 30fachen Ausgangswert statt. Die Werte der Stimulationen mit den unterschiedlich hohen Interferon- $\gamma$  Konzentrationen waren dagegen untereinander nicht statistisch signifikant verschieden.

Als Nächstes wurde der zeitliche Verlauf der Interferon- $\gamma$  vermittelten Induktion von IL-18BP mRNA untersucht (Abb. 3.5). Dazu wurden DLD-1 Zellen mit Interferon- $\gamma$  stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten der Anstieg der IL-18BP mRNA überprüft. Der früheste untersuchte

### 3 Ergebnisse

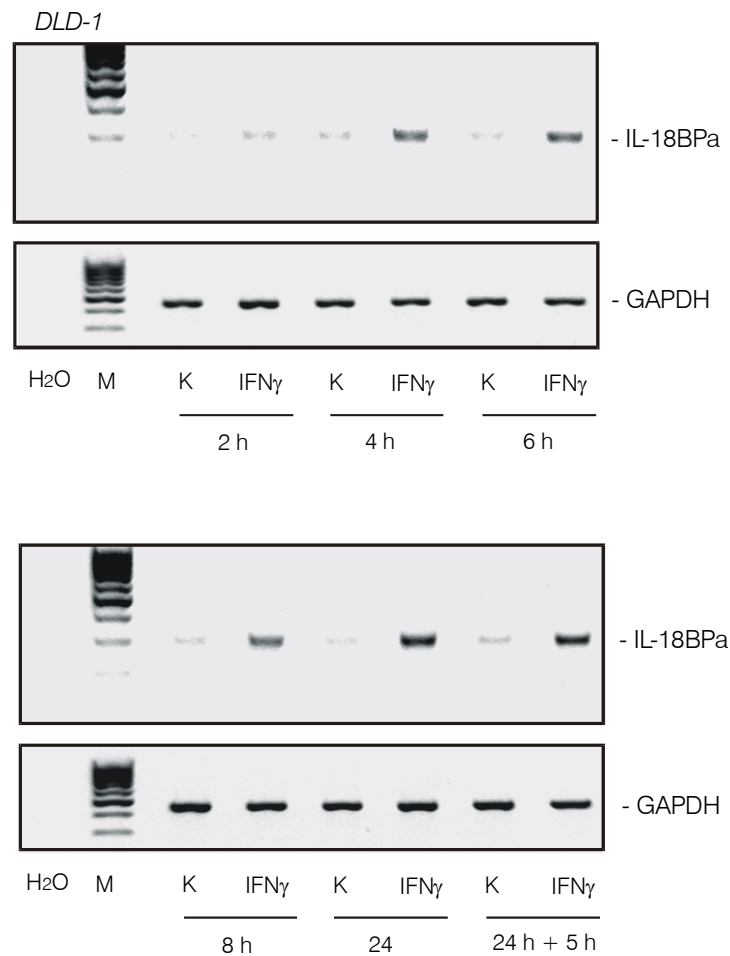


Abb. 3.5: Kinetik der Interferon- $\gamma$  vermittelten IL-18BP $\alpha$  Genexpression in DLD-1 Zellen. Nach einem gemeinsamen Start wurde nach 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden jeweils aus unstimulierten Kontrollzellen und aus mit Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ , 10 ng/ml) stimulierten Zellen die Gesamt-RNA extrahiert und später mit allen Proben eine gemeinsame RT-PCR für IL-18BP $\alpha$  und GAPDH durchgeführt. Ganz unten rechts abgebildet: Nach 24 Stunden Stimulation wurde das Interferon- $\gamma$  enthaltende Medium entfernt, 3-mal mit PBS gründlich gewaschen, frisches Kontrollmedium zugefügt und nach 5 weiteren Stunden die RNA isoliert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von 2 unabhängigen Experimenten ( $n = 2$ ). (Eine dritte Kinetik ist in Abb. 3.17 dargestellt.) K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker.

Zeitpunkt lag 2 Stunden nach Exposition mit Interferon- $\gamma$ . Hier war die Bandenstärke für IL-18BP noch praktisch unverändert. Bei der doppelten Laufzeit, d. h. nach 4 Stunden, war allerdings bereits eine deutliche Erhöhung der mRNA erkennbar, wobei zu dem späteren Zeitpunkt von 24 Stunden eine noch vollständigere Ausprägung dieses Effektes vorhanden war. Wenn außerdem nach 24 Stunden das Interferon- $\gamma$  durch gründliches Waschen mit PBS entfernt und das Ausmaß der IL-18BP $\alpha$  Genexpression weitere 5 Stunden später analysiert wurde, stellte sich kaum eine Verminderung des Signals dar. Dies spricht folglich gegen das Abschalten der einmal angekurbelten IL-18BP $\alpha$  Genexpression innerhalb eines Zeitraumes von wenigen Stunden.

Wie im vorangehenden Abschnitt dargelegt, wird IL-18BP $\alpha$  nicht nur in DLD-1 Zellen, sondern auch in verschiedenen anderen Zelltypen von nicht-epithelialelem Ursprung konstitutiv

### 3 Ergebnisse

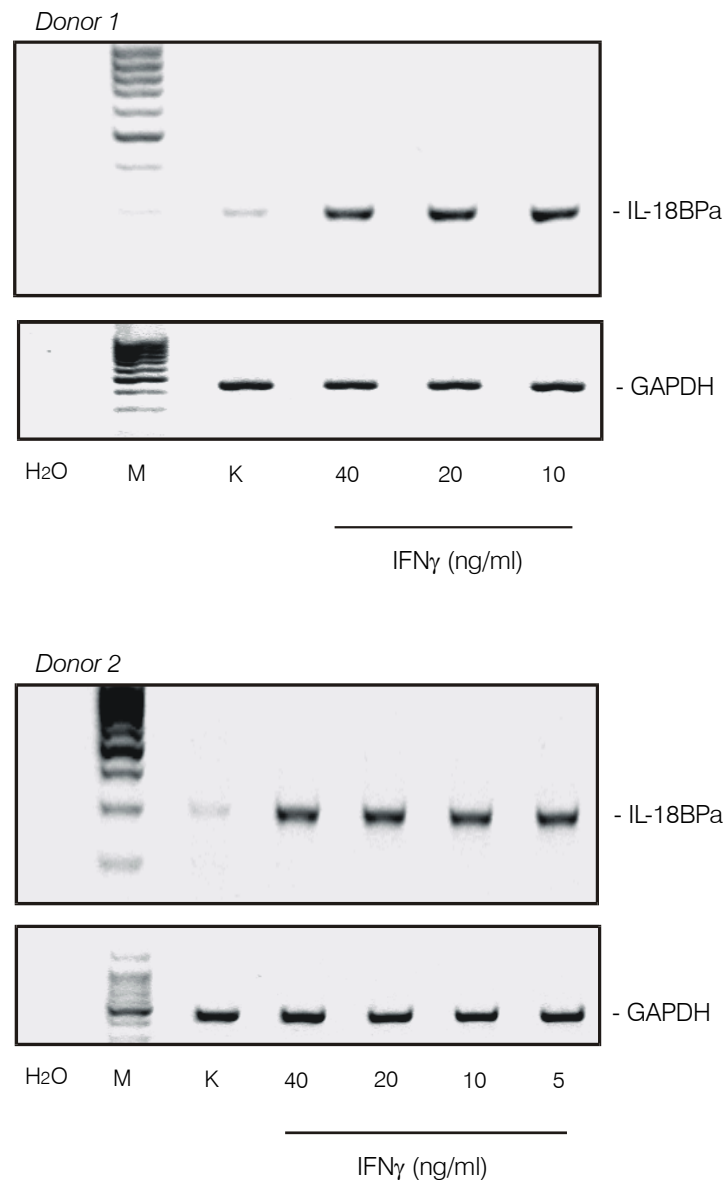


Abb. 3.6: Die IL-18BPα mRNA wird durch Interferon- $\gamma$  in primären humanen Mesangiumzellen induziert. Die Mesangiumzellen wurden für 20 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Interferon- $\gamma$  inkubiert. Dargestellt sind die RT-PCR Ergebnisse zwei verschiedener Donoren von insgesamt 4 unabhängigen Experimenten ( $n = 4$ ). K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker.

exprimiert. Es drängte sich die Frage auf, ob auch in diesen Zellen Interferon- $\gamma$  die mRNA des Bindungsproteins induziert. Um diesem Sachverhalt nachzugehen, wurden nun Experimente mit den primären humanen Mesangiumzellen durchgeführt, in denen diese mit den gleichen Konzentrationen von Interferon- $\gamma$  bei entsprechender Laufzeit der Versuche stimuliert wurden (Abb. 3.6). Da es sich um primäre Zellen handelte, die nur in begrenzten Quantitäten verfügbar waren, stellte die RT-PCR aufgrund ihrer Sensitivität wiederum die Methode der Wahl dar. Tatsächlich fand sich in den untersuchten Proben das gleiche Bild eines unzweifelhaften Anstiegs der IL-18BPα mRNA nach Reizung mit rekombinantem Interferon- $\gamma$ .



### 3 Ergebnisse

Es ist anzumerken, dass bei diesen Experimenten Mesangiumzellen von zwei verschiedenen menschlichen Donoren verwendet wurden, wobei keine Unterschiede in den Ergebnissen zu Tage traten. Im Übrigen konnte IL-18BP $\alpha$  auch in der humanen Mesangium-Zelllinie mit Hilfe von Interferon- $\gamma$  induziert werden (Abb. 3.7).

Als letzter Zelltyp rückten primäre Fibroblasten in den Fokus der Studien. Auch diese Zellen reagierten auf den Kontakt mit Interferon- $\gamma$  innerhalb von 20 Stunden mit einem Anstieg ihres Gehalts an mRNA für das Bindungsprotein von IL-18 (Abb. 3.8). Bei diesen Experimenten wurden auch niedrigere Interferon- $\gamma$  Konzentrationen von 1 und 0,5 ng/ml verwendet. Auch sie reichten aus, um in den Zellen die Genexpression von IL-18BP $\alpha$  anzuschalten.

Zusammengenommen beantworten also alle untersuchten Zelltypen, d. h. die DLD-1 Zellen, die Mesangiumzellen (einschließlich der Mesangium-Zelllinie) und die Fibroblasten, in übereinstimmender Weise die Stimulation mit Interferon- $\gamma$  durch einen klaren Anstieg der IL-18BP $\alpha$  mRNA. Die Vorstellung von IL-18BP als ein lediglich konstitutiv exprimiertes Gen muss insofern erweitert werden, dass es offensichtlich im Entzündungsprozess aktiviert und angeschaltet werden kann. IL-18BP lässt sich nunmehr in die lange Liste der von Interferon- $\gamma$  regulierten Gene einfügen. Bedeutsam ist, dass die gesteigerte Expression von IL-18BP der essentielle Bestandteil einer bisher unbekannten negativen Rückkopplungsschleife zu sein scheint, die in 3 Schritten abläuft: Zuerst wird im Entzündungsgeschehen IL-18 freigesetzt, welches die Produktion von Interferon- $\gamma$  durch NK- und T-Zellen bewirkt. Interferon- $\gamma$  seinerseits führt in ortsständigen Nicht-Immunzellen zur Akkumulation der IL-18BP $\alpha$  mRNA. Angenommen, dass diesem Effekt auch die Freisetzung von IL-18BP folgt, wird es sukzessiv zu einer Hemmung von IL-18 kommen, wodurch dann letztendlich auch die weitere Produktion von Interferon- $\gamma$  limitiert wird.

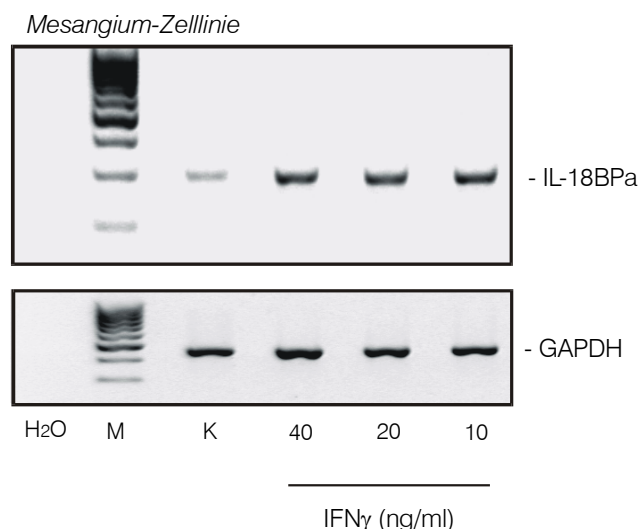


Abb. 3.7: Interferon- $\gamma$  bewirkt auch in einer Mesangium-Zelllinie die Akkumulation der mRNA von IL-18BP $\alpha$ . Die Analyse durch RT-PCR erfolgte im Anschluss an eine Stimulationsdauer von 21 Stunden (n = 2). K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker.

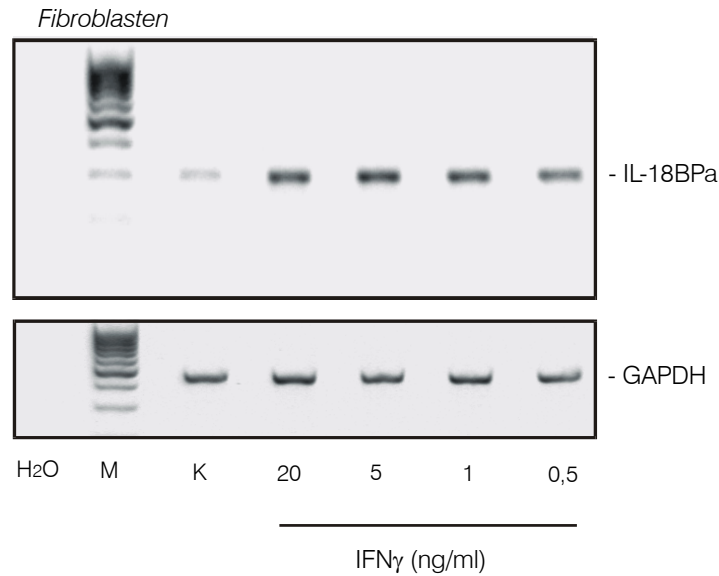


Abb. 3.8: Induktion der IL-18BPα mRNA durch Interferon-γ in primären humanen Fibroblasten. Die Zellen wurden für 20 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Interferon-γ stimuliert und anschließend wurde mit RT-PCR detektiert. Bemerkenswerterweise reichte auch die niedrigste Konzentration von Interferon-γ (0,5 ng/ml) aus, um die IL-18BPα mRNA hochzuregulieren (n = 4). K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker.

#### 3.1.3 LPS induziert einen Anstieg der Interleukin-18-Bindungsprotein mRNA in humanen Mesangiumzellen

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein integraler unverzichtbarer Bestandteil der Zellhülle gramnegativer Bakterien [219, 220]. Es gelangt durch Abgabe von Membranvesikeln und vor allem beim Absterben der Bakterienzellen in die Umgebung. Als Endotoxin stellt LPS einen bedeutenden Virulenzfaktor dar, wobei die sogenannte Lipid A Komponente für die meisten toxischen pathophysiologischen Wirkungen verantwortlich gemacht wird. Nachdem zuerst eine Bindung an ein Lipopolysaccharid-Bindeprotein (LBP) im Plasma stattfindet, kommt es zu spezifischen Interaktionen dieses LBP/LPS-Komplexes mit Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems und auf Nicht-Immunzellen. Im Einzelnen erfolgt im Zusammenspiel eine koordinierte Bindung an das Membranglykoprotein CD14, an den kürzlich identifizierten Toll-Like Rezeptor 4 (TLR4) und das Protein MD-2 [7, 221]. Die anschließend initiierte Signaltransduktionskaskade umfasst die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFκB und MAP-Kinasen, worauf u. a. die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8, TNFα, IL-12 und IL-18 ausgelöst wird [12, 31-33, 219, 222-224]. Mit anderen Worten besitzt LPS das Potential, der ursächlich auslösende Faktor für eine Aktivierung des Immunsystems sein zu können. Dem Immunsystem seinerseits steht mittels des TLR4 und anderer *Pattern Recognition Receptors* quasi ein Spürsinn für die Produkte von Mikroorganismen zur Verfügung, mit dem es frühzeitig eine Infektion erkennen und darauffolgend bekämpfen kann. Auf der anderen Seite kann es durch LPS zu einer Überaktivierung des Immunsystems und

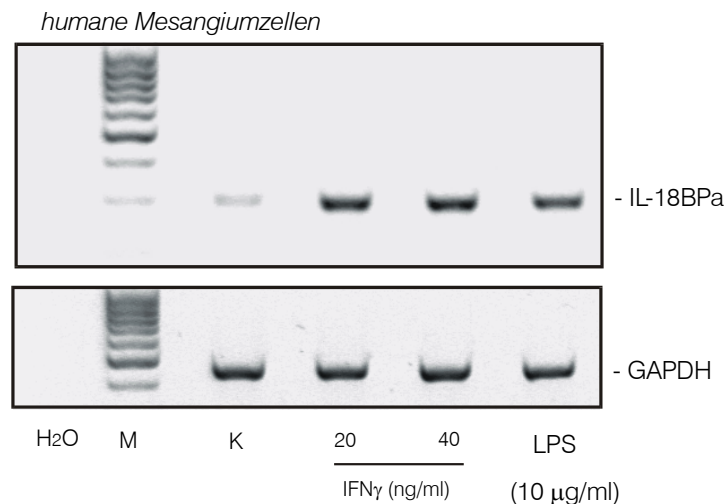


Abb. 3.9: LPS induziert einen Anstieg der IL-18BP $\alpha$  mRNA in primären humanen Mesangiumzellen. Die Zellen wurden für 20 Stunden entweder mit Interferon- $\gamma$  (20 ng/ml und 40 ng/ml) oder mit Lipopolysaccharid (LPS, 10  $\mu$ g/ml) stimuliert. Anschließend erfolgte die Extraktion der RNA und spezifischer Nachweis durch RT-PCR. Das Ergebnis der mit LPS stimulierten Zellen ist auf der äußeren rechten Spur der Abbildung dargestellt. Wie zu erkennen, bewirkt LPS ähnlich wie Interferon- $\gamma$  eine eindeutig gesteigerte Genexpression von IL-18BP $\alpha$ . (n = 3). K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker.

Entgleisung der Abwehrreaktionen mit verheerenden Folgen für den Organismus kommen. *De facto* lassen sich im Tierexperiment durch LPS nahezu alle Symptome des septischen Schocks, wie er im Rahmen einer gramnegativen Sepsis vorkommt, hervorrufen [219, 225, 226].

Aizawa *et al.* gelang die Isolierung von murinem IL-18BP aus dem Serum von Mäusen mit LPS induziertem Endotoxin-Schock [192]. Dies kann als ein Hinweis angesehen werden, dass bei der Sepsis nicht nur IL-18, sondern auch sein Gegenspieler erhöht ist. Ein Anstieg von IL-18BP *in vivo* könnte entweder sukzessive über die im vorigen Abschnitt beschriebene negative Rückkopplungsschleife der Interferon- $\gamma$  Regulierung zustande kommen oder aber zusätzlich direkt durch LPS bewirkt werden.

Beweise für das Zutreffen der letzteren Annahme konnten anhand der humanen Mesangiumzellen gesammelt werden. Wie in Abbildung 3.9 gezeigt, wird die IL-18BP $\alpha$  mRNA durch LPS Stimulation in den Zellkulturen hochreguliert, wobei Experimente mit den Zellen von zwei verschiedenen Donoren übereinstimmende Resultate lieferten. Dieser Effekt ist prinzipiell vergleichbar mit den Resultaten nach Interferon- $\gamma$  Stimulation. In einem einzelnen Experiment führte die Kombination beider Faktoren zu keiner weiteren Steigerung in der Intensität der induzierten Bande (nicht abgebildet).

Bis auf weiteres darf angenommen werden, dass diese induzierende Wirkung von LPS auf IL-18BP direkt ist, d. h. nicht sekundär über die Produktion anderer endogener Botenstoffe zustande kommt. Zumindest konnte die endogene Produktion von Interferon- $\gamma$  nach LPS ausgeschlossen werden, da Interferon- $\gamma$  auch in den Zellkulturüberständen der LPS behandelten Mesangiumzellen mittels ELISA nicht detektierbar war (Daten nicht abgebildet).

Dies wäre ohnehin ein sehr überraschender Befund gewesen, weil allgemein hin die Fähigkeit zur Produktion von Interferon- $\gamma$  nur bestimmten Immunzellen zugesprochen wird. Indessen bewirkt LPS durchaus eine entzündungsfördernde Aktivierung der Mesangiumzellen. So konnte z. B. 20 Stunden nach Behandlung mit LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) ein signifikanter Anstieg der Freisetzung des proinflammatorischen Chemokins IL-8 durch ELISA nachgewiesen werden (0,44 ng/ml vs. 15,67 ng/ml,  $P < 0,01$ ,  $n = 3$ , nicht abgebildet). Dieser Sachverhalt ist bereits vor längerer Zeit in der Literatur beschrieben worden [227].

Im Gegensatz zu den Mesangiumzellen führten verschiedene Konzentrationen von LPS in den epithelialen DLD-1 Kolonkarzinomzellen unter ansonsten gleichen Bedingungen zu keiner Veränderung der IL-18BP $\alpha$  Genexpression (Daten nicht abgebildet).

Indes verdeutlicht die Vermehrung der IL-18BP $\alpha$  mRNA durch LPS in Mesangiumzellen, dass die vielfältigen Wirkungen von LPS auf menschliche Zellen nicht nur in einer Stimulation entzündungsauslösender Botenstoffe besteht, sondern dass gleichzeitig auch antiinflammatorische Effekte angeschoben werden.

#### 3.1.4 Weitere untersuchte Entzündungsmodulatoren zeigten keinen Einfluss auf die Interleukin-18-Bindungsprotein mRNA Expression

Zu den weiteren aussichtsreichen Kandidaten mit einem denkbaren Effekt auf die Genexpression von IL-18BP gehört auch Interleukin-1. In der Tat weist Interleukin-1 eine hohe strukturelle Verwandtschaft zu Interleukin-18 auf. Auf der anderen Seite kann eine Bindungsaffinität und damit eine Neutralisation von IL-1 durch IL-18BP ausgeschlossen werden [191]. Weiterhin kann festgehalten werden, dass IL-1 und IL-18 trotz ihrer Homologie an unterschiedliche Membranrezeptoren binden, wobei allerdings deutliche Gemeinsamkeiten bezüglich der anschließenden Signaltransduktion bestehen [12, 29, 203]. Als eines der bedeutendsten proinflammatorischen Zytokine moduliert IL-1 die Expression einer unüberschaubaren Vielzahl von Genen mit immunologischen Aufgaben [12]. Unter anderem fallen darunter auch Rezeptoren für Zytokine. Beispiele sind eine Erhöhung des IL-2 Rezeptors sowie seines eigenen IL-1 Rezeptors II (IL-1RII) oder eine Erniedrigung des TNF $\alpha$  Rezeptors (TNFRp55) und des löslichen Rezeptors für IL-6. *Summa summarum* wäre es daher gut vorstellbar, dass IL-1 an der Steuerung von IL-18BP, welches funktionell einem löslichen Zytokinrezeptor gleichkommt, mitwirken könnte.

In den Experimenten wurden epitheliale DLD-1 Kolonkarzinomzellen für 21 Stunden mit IL-1 $\beta$  stimuliert und durch RT-PCR auf Veränderungen im Gehalt der IL-18BP $\alpha$  mRNA untersucht (Abb. 3.10A). IL-1 $\beta$  übte keinerlei Einfluss auf IL-18BP aus. Neben der abgebildeten IL-1 $\beta$  Konzentration von 50 ng/ml wurden mit dem gleichen Ergebnis parallel auch Konzentrationen von 25 ng/ml und 12,5 ng/ml verwendet. Auch in Mesangiumzellen präsentierte sich IL-1 $\beta$  wirkungslos bezüglich der Genexpression von IL-18BP (nicht abgebildet).

Neben IL-1 $\beta$  ist TNF $\alpha$  ein wichtiges proentzündliches Zytokin mit vielfältigen biologischen Aufgaben, welches u. a. nach Kontakt mit LPS freigesetzt wird und sich seinerseits beispiels-

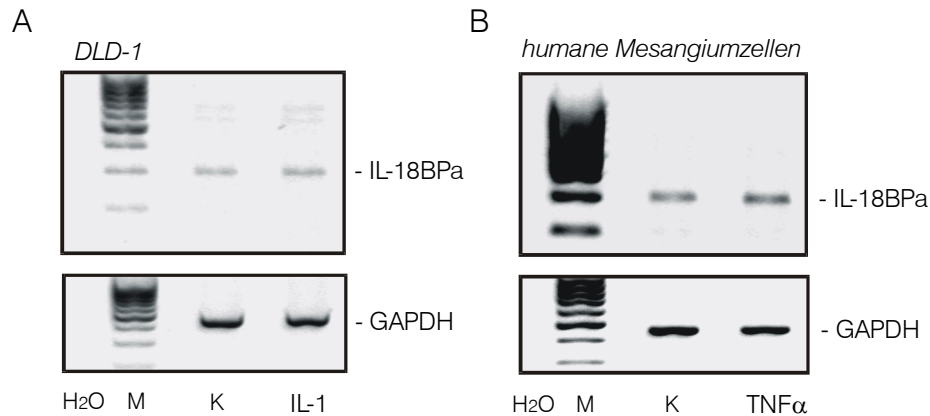


Abb. 3.10: Keine Effekte von Interleukin-1 und TNF $\alpha$  auf die mRNA Spiegel von IL-18BP $\alpha$ . (A) Nach 21 Stunden Stimulation von DLD-1 Kolonkarzinomzellen mit IL-1 (50 ng/ml) war die IL-18BP $\alpha$  mRNA unverändert. (B) Primäre humane Mesangiumzellen wurden für 20 Stunden mit TNF $\alpha$  (50 ng/ml) inkubiert. In der anschließenden RT-PCR zeigte sich gegenüber Kontrollzellen keine Erhöhung des Spiegels an IL-18BP $\alpha$  mRNA. K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker.

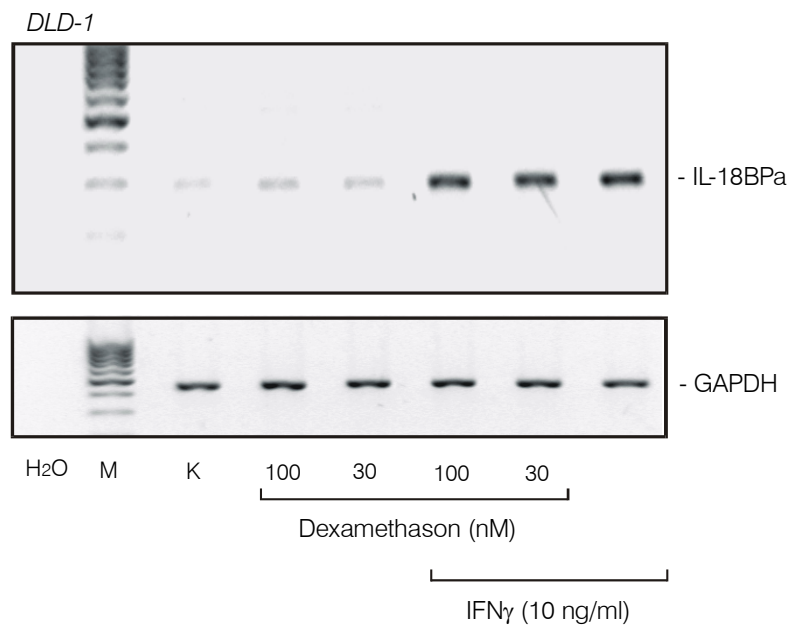


Abb. 3.11: Kein Einfluss von Dexamethason auf die Genexpression von IL-18BP $\alpha$ . DLD-1 Zellen wurden für 21 Stunden mit Dexamethason (100 nM und 30 nM), der Kombination von Interferon- $\gamma$  (10 ng/ml) plus Dexamethason und Interferon- $\gamma$  allein stimuliert. Die durchgeführte RT-PCR auf IL-18BP $\alpha$  mRNA zeigte weder einen induktiven Effekt von Dexamethason noch eine Hemmwirkung von Dexamethason auf den von Interferon- $\gamma$  bewirkten mRNA Anstieg. K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker.

weise an der Produktion von Interferon- $\gamma$  beteiligt. Anders als LPS und Interferon- $\gamma$  scheint TNF $\alpha$  alleine jedoch keinen Effekt auf die Synthese des IL-18BP auszuüben. Jedenfalls war der Gehalt der zugehörigen mRNA nach 20 Stunden Einwirkung auf Mesangiumzellen unverändert (Abb. 3.10B). Zur Belegung einer dennoch erfolgreichen Aktivierung der Zellen durch TNF $\alpha$  wurde in den Zellkulturüberständen desselben Experiments nach 20 Stunden das Chemokin IL-8 im ELISA gemessen. Es ist bekannt, dass TNF $\alpha$  die Freisetzung von IL-8 fördert [228]. Tatsächlich war in den Zellkulturüberständen eine 13fache Steigerung der IL-8 Konzentrationen durch TNF $\alpha$  gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen vorhanden (1,11 ng/ml vs. 14,62 ng/ml, nicht abgebildet).

Glukokortikoide gehören zu den potentesten entzündungshemmenden Pharmaka. Sie entfalten ihre Wirksamkeit über eine Beeinflussung der Gentranskription und der mRNA Halbwertszeiten von vielen am Entzündungsprozess beteiligten Proteinen [23]. Neben Enzymen wie der iNOS, COX-2 und PLA<sub>2</sub> ist besonders die Unterdrückung der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen ausschlaggebend. So wird durch Glukokortikoide die Transkription von IL-1, IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-8, MIP1 $\alpha$  etc. vermindert. Demgegenüber wird die Transkription des IL-1 Rezeptors II, der einen Lockvogel Rezeptor ohne Signaltransduktionswirkung darstellt und letztendlich zu einer Senkung der biologischen IL-1 Aktivität beiträgt, durch z. B. Dexamethason gesteigert [12, 23].

Bemerkenswert ist, dass Glukokortikoide offenbar keine Hemmwirkung auf die Transkription des proinflammatorischen IL-18 besitzen, sondern das vielmehr überraschenderweise eine gesteigerte Freisetzung von IL-18 durch diese immunsuppressive Substanzgruppe vorkommt [73, 229, 230]. Anscheinend wird dieser Effekt auch nicht durch eine gesteigerte Genexpression von IL-18BP antagonisiert. Zumindest übte Dexamethason in DLD-1 Zellen innerhalb 21 Stunden keine induzierende Wirkung auf den Spiegel der IL-18BP mRNA aus (Abb. 3.11). Außerdem ließ sich die durch Interferon- $\gamma$  angeregte Steigerung der IL-18BP Genexpression durch Koinkubation mit Dexamethason nicht beeinflussen.

Als Nächstes sollte eine Untersuchung über eine mögliche Beziehung des Transforming Growth Factor-beta (TGF $\beta$ ) zu IL-18BP angestellt werden. Die Botenstoffe der TGF $\beta$  Familie besitzen potente Wirkungen bezüglich der Regulation von Wachstum und Differenzierung für eine Vielzahl von Körperzellen [231]. Darüber hinaus ist TGF $\beta$  ein bedeutendes immunregulatorisches Zytokin, dem insbesondere anti-entzündliche Eigenschaften zugeschrieben werden [3, 232]. Dies wird z. B. dadurch unter Beweis gestellt, dass TGF $\beta$ <sup>-/-</sup> Knock-out-Mäuse wenige Wochen nach ihrer Geburt an einer generalisierten Entzündung erkranken und versterben [233]. Seine antiinflammatorischen Wirkungen entfaltet TGF $\beta$  nicht zuletzt durch eine direkte Antagonisierung von Interferon- $\gamma$  Effekten und eine Inhibition der Synthese von Interferon- $\gamma$  selbst [16, 232, 234, 235]. Folglich wäre es denkbar, dass TGF $\beta$  durch eine Induktion von IL-18BP eine Neutralisation von IL-18 mit nachgeschalteter verminderter Interferon- $\gamma$  Freisetzung herbeiführt. Bei einem ersten orientierenden Experiment mit einer Stimulation von DLD-1 Zellen durch TGF $\beta$ <sub>2</sub> (10 ng/ml) für 20 Stunden kam es jedoch zu keiner Veränderung der IL-18BP mRNA. Auch ließ sich durch die Kombination von Interferon- $\gamma$  mit

TGF $\beta_2$  keine Abschwächung der Interferon- $\gamma$  Induktion von IL-18BP $\alpha$  beobachten (Daten nicht abgebildet).

Die Aktivierung des Fas Antigens durch FasL leitet eine Kaskade ein, an deren Ende die Apoptose der betroffenen Zelle steht. Darüber hinaus kann Fas/FasL durch eine Aktivierung von NF $\kappa$ B auch proinflammatorische Eigenschaften ausüben [38, 236-238]. Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, ist IL-18 in der Lage die Fas/FasL vermittelte zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen hochzuregulieren. Zu erwähnen ist außerdem, dass es durch Interferon- $\gamma$  zu einer gesteigerten Expression von Fas Antigen kommt [239]. Die Frage ist berechtigt, ob sich IL-18BP in diesen komplexen zur Apoptose führenden Regelkreis von IL-18 und Interferon- $\gamma$  einschaltet. Würde nach Aktivierung des Fas Antigens die Zelle mit einer gesteigerten Freisetzung von IL-18BP reagieren, könnte dies im späteren Verlauf zu einer rückkoppelnden Bremsung der IL-18 / Interferon- $\gamma$  getriggerten Fas/FasL-Mechanismen führen. Für diese Hypothese ließen sich jedoch im Rahmen dieser Promotionsarbeit keine experimentellen Anhaltspunkte finden. Wurden DLD-1 Zellen zur Hochregulierung des Fas Antigens zuerst mit Interferon- $\gamma$  stimuliert und später ein Fas aktivierender Antikörper (mit der Bezeichnung DX2) hinzugefügt oder wurde dieser aktivierende Antikörper alleine angewendet, waren keinerlei Auswirkungen der Fas Aktivierung auf die IL-18BP $\alpha$  Expression zu notieren (Daten nicht abgebildet).

Das Zytokin Interleukin-4 (IL-4) wird maßgeblich von Th2-Zellen produziert und stärkt die humorale Immunabwehr über seine Förderung der Proliferation und Differenzierung von B-Zellen mit einem Klassenwechsel zu IgE [3]. IL-4 kann als einer der funktionellen Gegenspieler von IL-18 angesehen werden, da letzteres im Sinne einer Th1-Antwort agiert und diese Zellen zur Freisetzung von Interferon- $\gamma$  anregt. In DLD-1 Zellen zeigte IL-4 (20 ng/ml) keinen Effekt auf die Spiegel an IL-18BP $\alpha$  mRNA (Daten nicht abgebildet).

Zusätzlich zu den bisher genannten Faktoren wurde noch eine ganze Reihe anderer Substanzen auf eine mögliche Einflussnahme auf die IL-18BP Genexpression untersucht, die jedoch in keinem Fall vorhanden war. Eine Auflistung ist in Abbildung 3.12 wiedergegeben. Es bleibt anzumerken, dass es sich bei den Ergebnissen dieses Abschnitts natürlich nur um vorläufige Resultate handelt, die lediglich einen orientierenden Charakter haben können und in der Zukunft einer weiteren Abklärung und Bestätigung bedürfen. Denn dass in einzelnen Experimenten keine Änderung betreffs IL-18BP zu finden war, heißt natürlich nicht, dass die angewendeten Zytokine und Substanzen bei anderen Umständen, in anderen Zellsystemen und bei anderen Stimulationszeiten nicht doch eine Auswirkung auf die IL-18BP Genexpression besitzen können. Dennoch bilden diese Ergebnisse zumindest einen ersten Anhaltspunkt. Letztendlich zeigen sie doch, dass die Induktion der IL-18BP Genexpression ein spezifischer Effekt ist, der wahrscheinlich nur durch sehr wenige Stimuli (Interferon- $\gamma$  und LPS) ausgelöst und beeinflusst werden kann.

### 3 Ergebnisse

Faktor	Zelltyp	Veränderungen IL-18BPα mRNA
Interferon- $\gamma$	DLD-1, hMZ, hMZL, Fibroblasten	↑↑
LPS	hMZ	↑↑
LPS	DLD-1	↔
TNF $\alpha$	hMZ, hMZL	↔
IL-1	DLD-1, hMZ, hMZL	↔
IL-12 + IL-18	DLD-1, hMZL	↔
TGF $\beta_2$	DLD-1	↔
TGF $\beta_2$ + Interferon- $\gamma$	DLD-1	↑↑ (keine Hemmung)
LIF	DLD-1	↔
IL-4	DLD-1	↔
IL-4 + Interferon- $\gamma$	DLD-1	↑↑ (keine Hemmung)
Dexamethason	DLD-1	↔
Dexamethason + Interferon- $\gamma$	DLD-1	↑↑ (keine Hemmung)
Anti-Fas (DX2)	DLD-1	↔
Anti-Fas (DX2) + Interferon- $\gamma$	DLD-1	↑↑ (keine Hemmung)
Histamin	DLD-1	↔
Histamin + Interferon- $\gamma$	DLD-1	↑↑ (keine Hemmung)
SB203580 + Interferon- $\gamma$	DLD-1	↑↑ (keine Hemmung)
dBcAMP	DLD-1	↔
dBcAMP + Interferon- $\gamma$	DLD-1	↑↑ (keine Hemmung)
Zink + Interferon- $\gamma$	DLD-1	↑↑ (keine Hemmung)
Spermin	DLD-1	↔
Spermin + Interferon- $\gamma$	DLD-1	↑↑ (keine Hemmung)
Genistein	DLD-1, hMZ	↔
Genistein + Interferon- $\gamma$	DLD-1, hMZ	↑↑ (keine Hemmung)
ATRA	hMZ	↔
ATRA + Interferon- $\gamma$	hMZ	↑↑ (keine Hemmung)

Abb. 3.12: Auflistung der Faktoren welche bezüglich eines möglichen Einflusses auf die IL-18BP Genexpression untersucht wurden. Lediglich Interferon- $\gamma$  und LPS wirkten steigernd auf die Spiegel an IL-18BPα mRNA. Alle anderen Substanzen besaßen keine induzierende Wirkung bzw. waren nicht im Stande, die durch Interferon- $\gamma$  verursachte Steigerung der mRNA zu hemmen. Es handelt sich um vorläufige Ergebnisse mit meistens nur einem unabhängigen Experiment (RT-PCR). hMZ = primäre humane Mesangiumzellen. hMZL = humane Mesangium-Zelllinie. TGF $\beta_2$  = Transforming Growth Factor-beta2. LIF = Leukämie-Inhibitions-Faktor. IL-4 = Interleukin-4. Anti-Fas (DX2) = stimulierender Antikörper des Fas/FasL-Systems. SB203580 = Inhibitor der p38 MAPK Signaltransduktion. dBcAMP = Dibutyryl-cyclisches Adenosinmonophosphat. ATRA = All-Trans-Retinsäure. ↑↑ = Steigerung. ↔ = keine Änderung.



#### 3.1.5 Indirekte Kokulturen: Mit IL-12/IL-18 stimulierte PBMCs vermitteln die IL-18BP mRNA Expression in benachbarten DLD-1 Zellen oder humanen Mesangiumzellen

In den bisherigen Experimenten konnte belegt werden, wie rekombinantes Interferon- $\gamma$  in Zellkulturen ortsständiger Mesangiumzellen, DLD-1 Kolonkarzinomzellen und Fibroblasten zu einer gesteigerten Genexpression von IL-18BP führt. Da IL-18 seinerseits für die Freisetzung von Interferon- $\gamma$  aus NK- und T-Zellen (außer Th2-Zellen) verantwortlich ist, bildet die Induktion von IL-18BP durch Interferon- $\gamma$  vermutlich die Etappe eines regulativen Rückkopplungsmechanismus, an deren Ende die neutralisierende Wirkung von IL-18BP auf IL-18 steht. Interessant ist vor allem, dass in diesem Regelkreis eine Verschaltung immunologischer Vorgänge zwischen ganz verschiedenen Zelltypen, nämlich NK- und T-Zellen einerseits und ortsständigen Nicht-Immunzellen andererseits, besteht.

Diese theoretischen Überlegungen sollten nun im weiteren Vorgehen experimentell untermauert werden. Dafür wurden Experimente mit indirekten Kokulturen (Transwell-Assay, siehe Abb. 3.13) durchgeführt: Aus dem frischen Blut verschiedener Spender wurden PBMCs separiert. Diese gemischte Zellpopulation besteht, wie bereits an anderer Stelle erwähnt, zu über zwei Drittel aus T-Zellen und zu einem weit geringeren Prozentsatz auch aus NK-Zellen. Die PBMCs wurden in 6-Well-Gewebekulturplatten mit DLD-1 Zellen oder humanen Mesangiumzellen zusammengebracht. Beide Zelltypen befanden sich demzufolge im gleichen Nährmedium, wurden aber dennoch durch ein sogenanntes Transwell-Clear Insert voneinander getrennt gehalten. Dieses Insert war vergleichbar mit einem Sieb, dessen Porengröße so klein gewählt war, dass selbst die zur Migration fähigen PBMCs diese Barriere nicht überwinden konnten. Dementsprechend waren direkte Zell-Zellkontakte zwischen den PBMCs und den ortsständigen Zellen, wie sie ansonsten z. B. über Fas/FasL oder über die MHC-Komplexe mit den T-Zell-Rezeptoren vorkommen würden, unmöglich gemacht. Daher wurden auch alloreaktive Vorgänge zwischen den Zellen, welche ja von jeweils zwei verschiedenen Individuen abstammten, verhindert. Selbstverständlich war aber eine Diffusion von Zytokinen und anderen Botenstoffen durch das Insert möglich bzw. sogar erwünscht.

Unmittelbar nachdem der experimentelle Aufbau mit dem Zusammenbringen von PBMCs und den ortsständigen Zellen abgeschlossen war, erfolgte die Stimulation mit einer Kombination von rekombinantem IL-12/IL-18. Wie in Kapitel 1 eingehend dargelegt, konnte erwartet werden, dass die Th1-Zellen, die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen und die NK-Zellen aus der Fraktion der PBMCs diese Zytokinkombination mit einer stark erhöhten Freisetzung von endogenem Interferon- $\gamma$  beantworten. Natürlich waren auch die DLD-1 Zellen bzw. Mesangiumzellen gleichermaßen der Kombination von IL-12/IL-18 ausgesetzt. Es ist auch tatsächlich für Mesangiumzellen berichtet worden, dass sie u. a. auf IL-12 reagieren [240]. Die PBMCs ihrerseits reagieren auf IL-12 und IL-18 gewiss nicht nur alleine mit einer Freisetzung von Interferon- $\gamma$ , sondern es gerät eine ganze Lawine von Botenstoffen ins Rollen. Laut den Angaben in der Literatur, erschien ein Vorhandensein von z. B. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-13, GM-CSF, TNF $\alpha$ , Stickstoffmonoxid und Histamin (jeweils in verschiedenen hohen Quantitäten) möglich [29, 241]. Zusätzlich ist das natürliche, endogene Interferon- $\gamma$  aufgrund

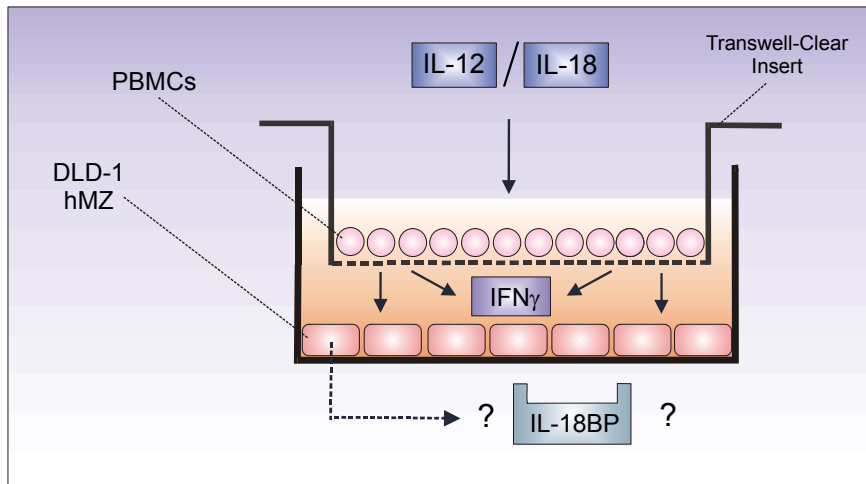


Abb. 3.13: Prinzip der indirekten Kokulturen. Die Abbildung stellt schematisch den Versuchsaufbau der indirekten Kokulturen im Transwell-Assay dar. Die frisch isolierten PBMCs wurden auf das Transwell-Clear Insert mit einer Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$  gebracht. Anschließend erfolgte die Stimulation mit der Kombination von rekombinantem IL-12/IL-18. Im weiteren Verlauf konnten die von den PBMCs freigesetzten Botenstoffe, wie z. B. Interferon- $\gamma$ , durch die Poren zu den darunter liegenden adhären DLD-1 Zellen oder humanen Mesangiumzellen gelangen. Am Ende des Experiments konnten die PBMCs entfernt und selektiv die RNA aus den DLD-1 Zellen bzw. Mesangiumzellen isoliert werden, um Aussagen zur Genexpression von IL-18BP zu erhalten. Parallel wurde mittels ELISA die Konzentration von Interferon- $\gamma$  im gemeinsamen Nährmedium gemessen.

von Variationen seiner Glykosylierung und des C-terminalen Endes als recht heterogen bezüglich Größe und Ladung charakterisiert worden, was allerdings offenbar für seine biologische Aktivität nicht von Bedeutung ist [16]. Insgesamt kann demnach davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Kokulturen um ein recht komplexes System handelt.

Als Zeitdauer der Experimente nach Beginn der Stimulation mit IL-12/IL-18 wurden 43 Stunden gewählt. Die Zeitspanne war also doppelt so lang wie bei den Experimenten der Stimulation von DLD-1 Zellen und Mesangiumzellen mit rekombinantem Interferon- $\gamma$ . Folglich bestand ausreichend Zeit für die PBMCs im ersten Schritt endogenes Interferon- $\gamma$  zu produzieren, welches dann im weiteren Verlauf eine Wirkung auf die ortsständigen Zellen entfalten sollte. Am Ende wurden die Zellkulturüberstände der Kokulturen abgenommen und im ELISA auf die Menge an Interferon- $\gamma$  untersucht. Parallel wurden die ortsständigen Zellen lysiert, die mRNA isoliert und mittels RT-PCR die Genexpression von IL-18BP evaluiert.

Die Abbildung 3.14 zeigt die Ergebnisse der Kokulturen mit PBMCs von 3 verschiedenen Donoren zusammen mit DLD-1 Kolonkarzinomzellen. In den Kontrollen wurden die PBMCs mit den DLD-1 Zellen zusammengebracht, ohne dass IL-12 und IL-18 zugefügt wurden. Nach 43 Stunden lagen in den Überständen dieser Kontrollen die Konzentrationen von Interferon- $\gamma$  unterhalb des Detektionslimits des ELISA. Dieses Detektionslimit lag bei den gewählten Verdünnungen der Überstände von 1 : 3 bei circa 100 pg/ml. Im Gegensatz dazu wurde in allen Proben der IL-12/IL-18 stimulierten Kokulturen Interferon- $\gamma$  gefunden. Die Konzentrationen bei 3 verschiedenen Donoren betrugen 8,7 ng/ml, 5,4 ng/ml und respektive

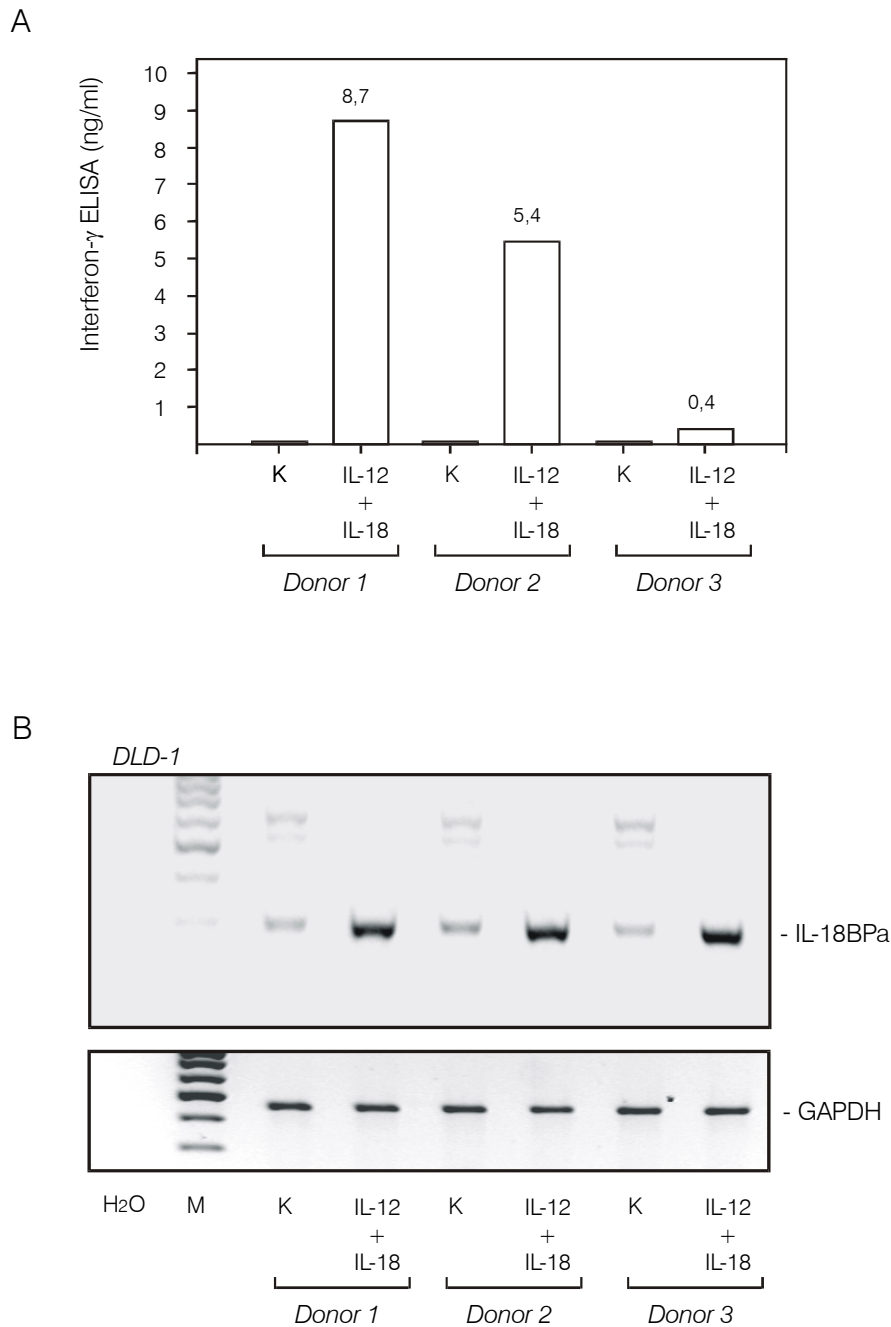


Abb. 3.14: Indirekte Kokulturen von DLD-1 Zellen zusammen mit humanen PBMCs. Aus dem peripheren Blut gesunder Donoren wurden PBMCs isoliert und mit DLD-1 Zellen zusammengebracht. Direkte Zell-Zellkontakte wurden dabei durch ein Transwell-Clear Insert (0,4 µm Porengröße) unterbunden. Die Kokulturen wurden entweder als Kontrollzellen gehalten oder mit der Kombination von IL-12 (20 ng/ml) und IL-18 (80 ng/ml) stimuliert. (A) Nach 43 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und mittels ELISA die Interferon-γ Produktion untersucht. (B) Zum anderen wurde aus den DLD-1 Zellen derselben Kokulturen die RNA isoliert und durch RT-PCR die Expression von IL-18BPα nachgewiesen. (Die PBMCs wurden verworfen.) Dargestellt sind identische Experimente mit PBMCs von drei verschiedenen Donoren. K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker.

0,4 ng/ml. Gleichzeitig war in den DLD-1 Zellen aller IL-12/IL-18 behandelten Kokulturen eine enorme Steigerung der mRNA von IL-18BPa zu konstatieren. Diskussionswürdig bleibt, warum in dem Ansatz mit den PBMCs des dritten Donors mit 0,4 ng/ml eine deutlich niedrigere Interferon- $\gamma$  Konzentration vorhanden war als bei den anderen Experimenten. Bemerkenswert ist jedoch, dass selbst diese Konzentration ausreichend war, um einen maximalen Anstieg der IL-18BPa mRNA herbeizuführen. Dies steht im Einklang mit den im Abschnitt 3.1.2 dargelegten Ergebnissen, bei denen in Fibroblasten auch noch mit 0,5 ng/ml rekombinantem Interferon- $\gamma$  die IL-18BP Genexpression induziert werden konnte.

In den Kokulturen von PBMCs mit humanen Mesangiumzellen war in den unstimulierten Ansätzen ebenfalls kein Interferon- $\gamma$  messbar, sondern es trat erst bei Behandlung mit IL-12/IL18 auf (Abb. 3.15A). In Korrelation zu dem Interferon- $\gamma$  Spiegel war dann auch die mRNA von IL-18BPa in den Mesangiumzellen erhöht (Abb. 3.15B).

Um auszuschließen, dass diese Steigerung der IL-18BP mRNA durch einen direkten Einfluss von IL-12 und IL-18 auf die Nicht-Immunzellen zustande kommt, wurden in Kontrollexperimenten DLD-1 Zellen ohne PBMCs dieser Zytokinkombination ausgesetzt. Der IL-18BPa mRNA Gehalt erwies sich in diesen Experimenten als unverändert gegenüber unstimulierten DLD-1 Zellen ( $n = 3$ , Daten nicht abgebildet). In einem früheren Experiment war auch in der humanen Mesangium-Zelllinie kein Effekt von IL-12/IL-18 auf die IL-18BP Genexpression beobachtet worden (nicht abgebildet). Es lag also die Schlussfolgerung auf der Hand, dass IL-12/IL-18 über den Umweg der endogenen Interferon- $\gamma$  Synthese von Seiten der PBMCs das Gen von IL-18BP anschalten. Zweifelsohne könnte aber zusätzlich ein anderer von den PBMCs produzierter Faktor für die gesteigerte IL-18BP Genexpression mitverantwortlich sein. Zu einer eingehenderen Überprüfung der Rolle von Interferon- $\gamma$  wurde deshalb den Kokulturen gleichzeitig mit IL-12/IL-18 ein monoklonaler neutralisierender Anti-IFN $\gamma$ -Antikörper zugegeben. Wie Abbildung 3.15B illustriert, ließ sich auf diese Weise die sonst durch IL-12/IL-18 angeschobene Zunahme der IL-18BPa mRNA in den Mesangiumzellen verhindern. Gleichzeitig maskierte bzw. verhinderte der Anti-IFN $\gamma$ -Antikörper die Detektion von Interferon- $\gamma$  im ELISA (Abb. 3.15A). Ein Kontroll-Antikörper blieb erwartungsgemäß sowohl im Interferon- $\gamma$  ELISA als auch bezüglich der IL-18BPa mRNA ohne Auswirkungen.

In Zusammenfassung konnte in den durchgeführten Experimenten mit indirekten Kokulturen die These eines negativen Feedback-Mechanismus über die Stationen IL-18, Interferon- $\gamma$  und IL-18BP gestützt werden. Die PBMCs lassen dem Aufeinandertreffen mit IL-12/IL-18 die Ausschüttung von Interferon- $\gamma$  folgen, das sukzessive in den benachbarten DLD-1 oder Mesangiumzellen die Expression von IL-18BP einleitet. Offenkundig produzieren die PBMCs gleichzeitig keine anderen Zytokine und Botenstoffe, welche den Interferon- $\gamma$  Effekt auf IL-18BP zunichte machen würden. Ferner besitzt in diesem Zusammenhang die Kombination von IL-12 und IL-18 auf die DLD-1 Zellen bzw. Mesangiumzellen ebenso keine Interferon- $\gamma$  antagonisierende Wirkung. Vielmehr sind die beiden Zytokine nur im Beisein von PBMCs in der Lage, das Ausmaß der IL-18BP Genexpression in ortsständigen Nicht-Immunzellen anzuheben. Auf diese Weise sind letztere dazu fähig, den Aktivierungsstatus benachbarter Leukozyten zu modellieren. Dieses Beispiel verdeutlicht somit anschaulich die Möglichkeiten des Signalaustausches von Immunzellen und Nicht-Immunzellen im Rahmen einer Entzündung.

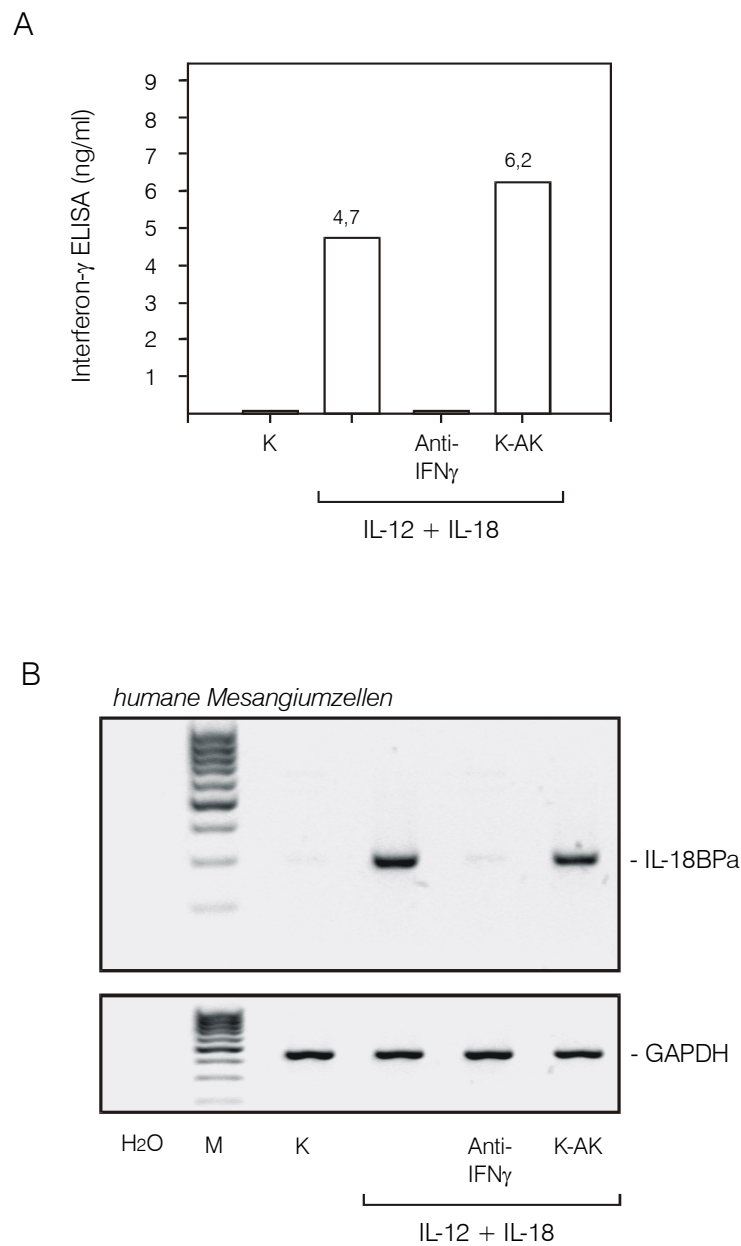


Abb. 3.15: Indirekte Kokulturen von primären humanen Mesangiumzellen mit PBMCs. Frisch isolierte PBMCs wurden für 43 h mit humanen Mesangiumzellen zusammengeführt. Dabei blieben die Zellen entweder als unstimulierte Kontrolle oder es wurde die Kombination von IL-12 (12,5 ng/ml) und IL-18 (30 ng/ml) zugefügt. Neben der alleinigen Kombination von IL-12 und IL-18 wurde zur Aufhebung Interferon- $\gamma$  verursachter Effekte ein neutralisierender Anti-Interferon- $\gamma$ -Antikörper (20  $\mu$ g/ml) sowie ein Kontroll-Antikörper (20  $\mu$ g/ml) angewendet. (A) Interferon- $\gamma$  ELISA der Zellkulturüberstände. (B) RT-PCR für IL-18BP $\alpha$  der Mesangiumzellen. K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker. Anti-IFN $\gamma$  = neutralisierender Anti-Interferon- $\gamma$ -Antikörper. K-AK = Kontroll-Antikörper.

### 3.2 Untersuchungen über Interleukin-18-Bindungsprotein auf Protein-Ebene

#### 3.2.1 Interferon- $\gamma$ bewirkt die Freisetzung von Interleukin-18-Bindungsprotein durch DLD-1 Zellen

Im ersten Teil dieser Promotionsarbeit mussten die Untersuchungen über die Genexpression von IL-18BP auf die mRNA-Ebene beschränkt bleiben. Dies änderte sich erst als mit spezifischen Antiseren gegen IL-18BP die Etablierung eines Western Blot möglich war.

Mittels RT-PCR und RNase Protection Assay konnte in den vorangehenden Abschnitten eine starke Induktion der IL-18BP mRNA durch Interferon- $\gamma$  in verschiedenen Nicht-Immunzellen belegt werden. Die überragende Fragestellung hinsichtlich der nun anstehenden Versuche war, ob diese Induktion der IL-18BP mRNA auch Veränderungen des Gehalts an IL-18BP auf Protein-Ebene zur Folge hat. Für diese Experimente wurde exemplarisch die DLD-1 Kolonkarzinom-Zelllinie ausgewählt.

Zuerst wurde versucht IL-18BP intrazellulär nachzuweisen, was aber auch bei Stimulation mit Interferon- $\gamma$  nicht möglich war. Da davon ausgegangen werden konnte, dass IL-18BP ein Protein ist, welches von Zellen sezerniert wird und seine biologische Funktion extrazellulär erfüllt, lag es nahe als Nächstes eine Detektion in den Zellkulturüberständen anzustreben.

In der Tat ließ sich in den Zellkulturüberständen von Interferon- $\gamma$  stimulierten DLD-1 Kolonkarzinomzellen eine starke immunreaktive Bande nachweisen, während diese Bande nicht in den unstimulierten Kontrollen auftrat (Abb. 3.16). Die Molekulargewichtsgröße von  $\sim 45\text{kDa}$  entsprach der Größe von IL-18BP. Eine Immundetektion mit den Antiseren von zwei verschiedenen Kaninchen, welche mit dem identischen für IL-18BP spezifischen Peptid immunisiert worden waren, lieferte übereinstimmende Resultate (Abb. 3.16A und 3.16B). Bei sehr kurzen Belichtungszeiten der Photofilme deutete sich die Immunreaktivität als eine Doppelbande mit zwei beieinanderliegenden etwa gleichstarken Einzelbanden an.

Zusätzlich zur Immundetektion wurden die Proteine auf den PVDF-Membranen unspezifisch mit Ponceau S bzw. die Polyacrylamid-Gele mit Coomassie angefärbt. Die Ponceau S Färbungen sind in Abbildung 3.16 jeweils auf der rechten Seite mit abgebildet. Anhand dieser Kontrollen ließen sich Unterschiede in den Laufspuren der unstimulierten und der Interferon- $\gamma$  behandelten Überständen bezüglich des Gehalts an Gesamtprotein überprüfen. Wenn überhaupt, traten solche Unterschiede nur gelegentlich und moderat auf. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die immunreaktive Bande aus TCA-Präzipitaten Interferon- $\gamma$  behandelter Zellen ein Artefakt ist, das durch eine ungleiche (viel höhere) Proteinbeladung der entsprechenden Laufspur zustande kommt.

Aus den oben genannten Ergebnissen ließ sich die Schlussfolgerung ziehen, dass DLD-1 Kolonkarzinomzellen durch Interferon- $\gamma$  zu einem gewaltigen Anstieg der Freisetzung von IL18BP angeregt werden. Da eine hochgradige Glykosylierung von IL-18BP berichtet worden ist, mögen differierende Glykosylierungsgrade des Proteins die Ursache für die sich andeutende Doppelbande bzw. eine Heterogenität des Molekulargewichts sein.

### 3 Ergebnisse

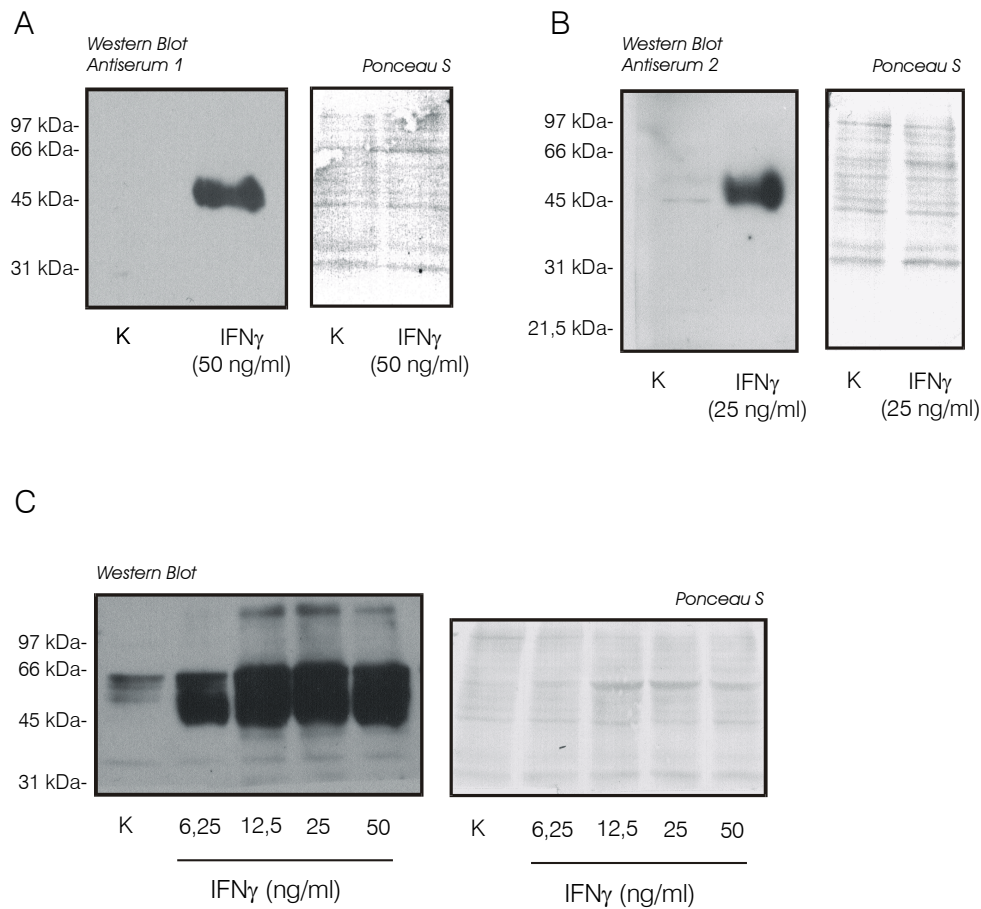


Abb. 3.16: Freisetzung von IL-18BP aus DLD-1 Zellen nach Stimulation mit Interferon- $\gamma$ . Die DLD-1 Zellen wurden in serumfreiem Medium entweder mit Interferon- $\gamma$  oder als unstimulierte Kontrollen gehalten. Nach 43 Stunden erfolgte die TCA-Präzipitation der Zellkulturüberstände mit anschließender Analyse durch Western Blot. Als Erstantikörper dienten polyklonale Antiseren von 2 Kaninchen, die mit einem Peptid identisch zu einem Teil von IL-18BP immunisiert worden waren. Die Membranen der Western Blots wurden am Ende mit Ponceau S gefärbt, um die gleichmäßige Beladung der Spuren mit Gesamt-Protein zu überprüfen. (A) und (B) Die Antiseren beider Kaninchen zeigten übereinstimmende Ergebnisse ( $n = 4$ ). (C) Dosis-Wirkungs-Experiment, d. h. Stimulation der DLD-1 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Interferon- $\gamma$  ( $n = 2$ ). K = unstimulierte Kontrollzellen.

Die in den Abbildungen 3.16A und 3.16B dargestellten Experimente wurden mit Interferon- $\gamma$  Konzentration von 25 und 50 ng/ml durchgeführt. Es ließ sich jedoch zeigen, dass auch mit geringeren Konzentrationen von Interferon- $\gamma$  (12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml) eine Freisetzung von IL-18BP bewirkt werden konnte (Abb. 3.16C). Als Stimulationsdauer wurde wie bei den vorangegangenen Experimenten 43 Stunden gewählt.

Der zeitliche Verlauf der Genexpression und Sekretion von IL-18BP nach Zugabe von 50 ng/ml Interferon- $\gamma$  ist in Abbildung 3.17 ersichtlich. Alle Zellen des Experiments wurden zu einem gemeinsamen Zeitpunkt mit Interferon- $\gamma$  stimuliert. Nach 8, 16, 22 und 42 Stunden wurden die Zellkulturüberstände jeweils einer Gewebekulturschale von Interferon- $\gamma$  behandelten und unstimulierten Zellen präzipitiert. Die Präzipitate aller Zeitpunkte wurden in einem

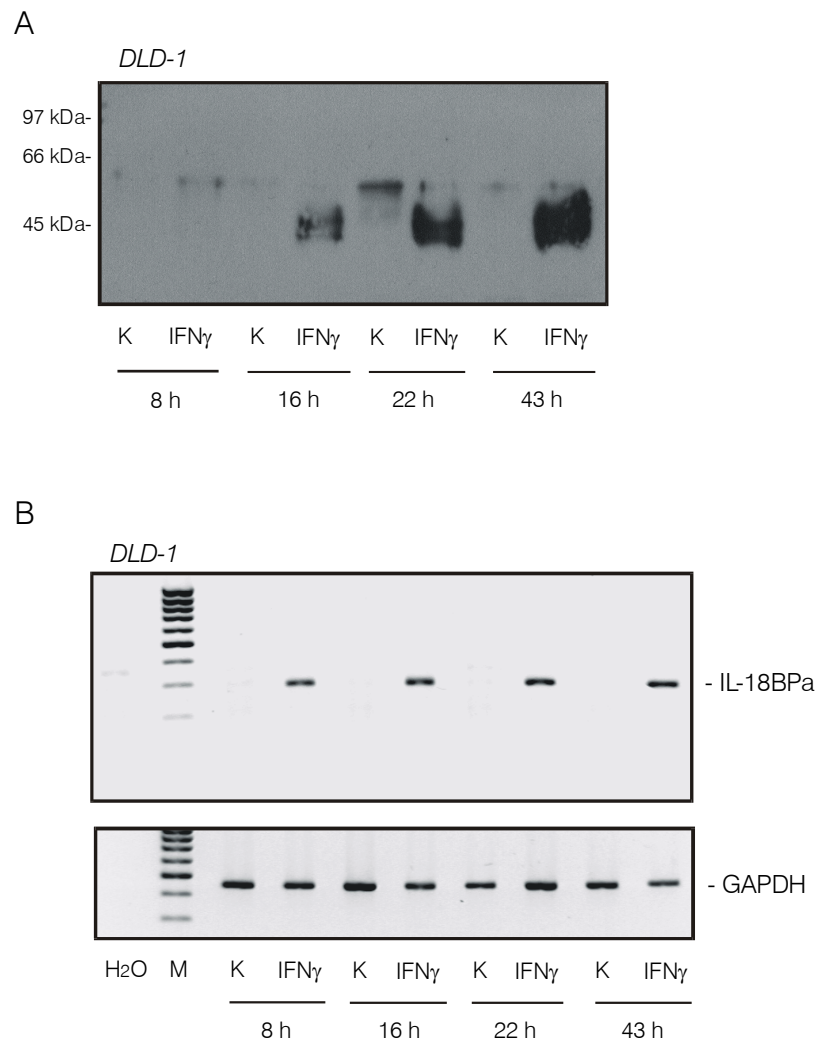


Abb. 3.17: Kinetik der Freisetzung von IL-18BP $\alpha$  aus DLD-1 Zellen nach Stimulation mit Interferon- $\gamma$ . Die DLD-1 Zellen wurden jeweils als unstimulierte Kontrollen gehalten oder mit Interferon- $\gamma$  (50 ng/ml) behandelt. (A) Zu den angegebenen Zeitpunkten (8 h, 16 h, 22 h und 43 h) wurden die Überstände abgenommen, mit TCA präzipitiert und im Western Blot auf den Gehalt an IL-18BP $\alpha$  untersucht. (B) Parallel wurden die Zellen desselben Experiments lysiert und eine RT-PCR für IL-18BP $\alpha$  durchgeführt. K = unstimulierte Kontrollzellen.

gemeinsamen Western Blot untersucht. Parallel wurde aus den Zellen die RNA isoliert und eine RT-PCR der IL-18BP mRNA durchgeführt. Wie Abbildung 3.17A zeigt, war nach 8-stündiger Stimulation mit Interferon- $\gamma$  noch kein IL-18BP $\alpha$  in den Überständen nachweisbar, wohl aber bereits nach 16 Stunden. Das Fehlen einer Immunreaktivität nach 8 Stunden widerlegte Überlegungen, wonach die beobachtete Bande ein Artefakt durch Verunreinigungen in der zugegebenen Interferon- $\gamma$  Lösung hätte sein können. Nach 22 Stunden und 42 Stunden war eine weitere kontinuierliche Erhöhung bzw. Anreicherung des IL-18BP Gehalts in den Überständen dokumentierbar. Demgegenüber war in den Überständen der unstimulierten DLD-1 Kontrollzellen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Freisetzung von IL-18BP messbar.



Als Nebenbefund auf den mit Ponceau S gefärbten Membranen fiel der mit fortschreitender Zeit zunehmende Gesamtproteingehalt in allen Überständen auf (nicht abgebildet). Dies lässt sich plausibel durch eine zeitliche Anreicherung einer Vielzahl von Proteinen, die von den DLD-1 Zellen sezerniert werden, erklären. Wichtiger ist, dass zu einem gemeinsamen Zeitpunkt keine maßgeblichen Unterschiede zwischen Überständen von Kontrollzellen und Interferon- $\gamma$  stimulierten Zellen bestanden.

Erwartungsgemäß wurde die IL-18BP $\alpha$  Freisetzung von einer Erhöhung des zellulären mRNA Gehalts für IL-18BP $\alpha$  begleitet (Abb. 3.17B). Die Veränderungen auf mRNA-Ebene waren bereits nach 8 Stunden ausgeprägt, schritten also dem Erscheinen von IL-18BP $\alpha$  in den Überständen voran.

In Zusammenfassung bietet sich deshalb die Vorstellung an, dass Interferon- $\gamma$  mittels einer erheblichen Erhöhung der IL-18BP mRNA eine Steigerung der Translation bewirkt, an die sich umgehend die Abgabe von IL-18BP $\alpha$  in die Umgebung durch ortsständige Nicht-Immunzellen anschließt.

## 3.3 Untersuchungen über Interleukin-18

### 3.3.1 Humane Mesangiumzellen exprimieren keine mRNA für IL-18

Wie in Kapitel 1 beschrieben, ist eine Vielzahl menschlicher Zellen zu der Produktion von IL-18 fähig. Darunter sind Makrophagen bzw. Antigen-Präsentierende-Zellen ebenso vertreten wie Keratinozyten, Enterozyten, Atemwegsepithelzellen, Osteoblasten u. a.

Für das Verständnis pathologischer Vorgänge in der Niere, wie z. B. der Glomerulonephritiden wäre es von Bedeutung, ob auch Mesangiumzellen eine Quelle dieses proinflammatorischen Zytokins sein können.

Zur Abklärung dieser Frage wurde mRNA aus kultivierten humanen Mesangiumzellen isoliert und eine RT-PCR für IL-18 durchgeführt (Abb. 3.18). Sogar nach 36 Zyklen und bei den sensitivsten Einstellungen der UV-Gel-Kamera waren keinerlei Spuren einer zu IL-18 korrespondierenden Bande sichtbar. Die RT-PCR Methode funktionierte dabei einwandfrei, wie RNA aus HaCaT Keratinozyten beweist, die parallel in demselben Experiment als positive Kontrolle mitgeführt wurde und eine ausnehmend starke Bande lieferte.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob – wenn schon nicht in unstimulierten Kontrollzellen – eine Genexpression von IL-18 durch die Stimulation mit Interferon- $\gamma$  oder LPS angeregt werden kann. *In vivo* bildet LPS einen maßgeblichen Stimulus für die Freisetzung von IL-18 [31, 242]. Freilich war selbst nach Interferon- $\gamma$  oder LPS keinerlei IL-18 mRNA in den Mesangiumzellen zu detektieren (Abb. 3.18). Ungeachtet dessen wurde in den gleichen Proben ein deutlicher Anstieg der mRNA für IL-18BP $\alpha$  durch die beiden Faktoren detektiert (hier nicht abgebildet), was das erfolgreiche Ansprechen der Zellen auf die Stimulation dokumentiert.

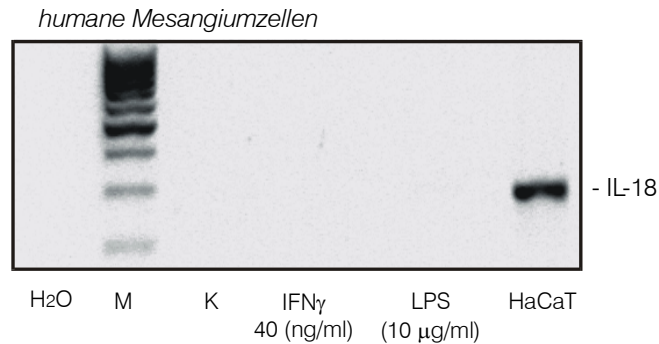


Abb. 3.18: Primäre humane Mesangiumzellen exprimieren kein IL-18. Aus denselben Experimenten bei denen eine Induktion von IL-18BPa vorhanden war, wurde cDNA für die IL-18 PCR verwendet. Selbst nach 36 Zyklen ließ sich keinerlei Expression von IL-18 in unstimulierten Mesangiumzellen bzw. nach 20 h Inkubation mit Interferon- $\gamma$  (40 ng/ml) oder LPS (10 µg/ml) aufdecken. Als Positivkontrolle zur Evaluierung der PCR Methode wurde RNA aus HaCaT Keratinozyten verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Heiko Kämpfer). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis bei insgesamt 4 unabhängigen Experimenten mit Interferon- $\gamma$  und 2 unabhängigen Experimenten mit LPS. K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker. HaCaT = Positivkontrolle, d. h. RNA aus HaCaT Zellen.

Es kann angenommen werden, dass aufgrund der Abwesenheit der mRNA folglich auch keine Translation geschweige denn Freisetzung des IL-18 Proteins durch Mesangiumzellen stattfindet. Mit dieser fehlenden Eigenschaft stehen Mesangiumzellen keineswegs allein, denn auch andere Zelltypen des Körpers, wie z. B. Endothelzellen und glatte Muskelzellen exprimieren nachweislich kein IL-18 [243].

#### 3.3.2 DLD-1 Zellen besitzen mRNA für IL-18 sowie intrazelluläres proIL-18

Es ist bekannt, dass normale Enterozyten in der Lage sind IL-18 zu exprimieren. Bis zur Durchführung der vorliegenden Promotionsarbeit war allerdings die Frage ungeklärt, ob die humane epitheliale Kolonkarzinom-Zelllinie DLD-1 ebenfalls zur Produktion von IL-18 fähig ist. Um Licht in diesen Sachverhalt zu werfen, wurde zuerst mit RT-PCR das Vorhandensein von IL-18 mRNA in unbehandelten DLD-1 Zellen überprüft. Wie Abbildung 3.19A wiedergibt, fand sich in den Zellen tatsächlich eine deutliche zur IL-18 mRNA korrespondierende Bande. Da angenommen werden konnte, dass der Transkription des IL-18 Gens auch die Translation zum Protein folgt, wurden im nächsten Schritt Proteinlysate der DLD-1 Zellen im Western Blot untersucht (Abb. 3.19B). Als Positivkontrollen des Western Blot standen sowohl rekombinantes reifes IL-18 (PeproTech, Inc.) als auch proIL-18 (R&D Systems) zur Verfügung. *De facto* fand sich in den unstimulierten DLD-1 Zellen eine spezifische Bande, die auf gleicher Höhe wanderte wie rekombinantes proIL-18, d. h. bei einem Molekulargewicht von 24 kDa. Bei kurzen Belichtungszeiten der Photofilme offenbarte diese Bande das Bild von zwei eng beieinander liegenden Einzelbanden. (Möglicherweise handelt es sich dabei um zwei verschiedene posttranslationale Modifikationen von proIL-18. Eine definitive Erklärung betreffs

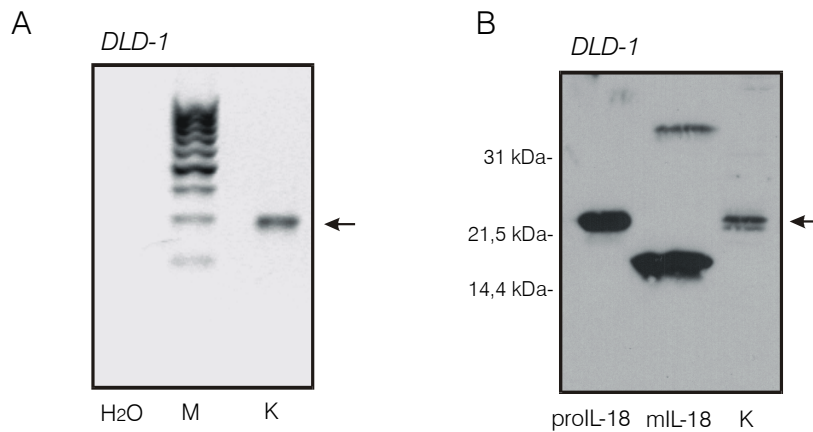


Abb. 3.19: Konstitutiver Nachweis von IL-18 mRNA und Protein in der DLD-1 Kolonkarzinom-Zelllinie. (A) Nach 31 Zyklen RT-PCR für IL-18 zeigte sich in unbehandelten DLD-1 Zellen eine deutliche konstitutive Bande ( $n = 4$ ). H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker. K = unstimulierte DLD-1 Zellen. (B) Aus DLD-1 Zellen wurden Proteinlysate hergestellt, diese mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und Western Blots mit einer polyklonalen Anti-IL-18-Antikörperverdünnung durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden sowohl rekombinantes IL-18-Vorläuferprotein (proIL-18) als auch rekombinantes reifes IL-18 (mIL-18) aufgetragen. Wie zu erkennen, konnte in den DLD-1 Zellen proIL-18, aber kein reifes IL-18 detektiert werden ( $n = 4$ ).

der Natur dieser Doppelbande kann an dieser Stelle jedoch nicht abgegeben werden.) Es wurden keine Banden unterhalb des Molekulargewichts von proIL-18 detektiert. Dies spricht gegen eine Anhäufung von reifem IL-18 (18 kDa) bzw. inaktiver IL-18 Spaltprodukte (16 kDa und 15 kDa [39]) innerhalb der DLD-1 Zellen.

In einem Satz zusammengefasst, exprimieren die DLD-1 Kolonkarzinomzellen also IL-18 und speichern dieses intrazellulär in Form von proIL-18, während in den Zellen kein reifes IL-18 nachweisbar ist.

#### 3.3.3 Keine Anhaltspunkte für eine Regulation von IL-18 in DLD-1 Zellen

IL-18 und IL-18BP sind immunologische Gegenspieler und die entgeltliche Wirkungsintensität von IL-18 korreliert entsprechend nicht nur mit seiner absoluten Menge, sondern ergibt sich vielmehr aus der Nettobilanz zu seinem neutralisierenden Bindungsprotein. Aus Sicht von IL-18BP könnte eine Erhöhung seiner Genexpression theoretisch durch eine gleichzeitig gesteigerte Produktion von IL-18 begleitet und schlussendlich in den Auswirkungen zunichte gemacht werden. Nachdem u. a. für die epithelialen DLD-1 Kolonkarzinomzellen gezeigt werden konnte, dass Interferon- $\gamma$  einem dramatischen Anstieg der Expression von IL-18BP herbeiführt, schien es daher interessant zu klären, ob Interferon- $\gamma$  gleichzeitig einen Effekt auf IL-18 ausübt. Zu diesem Zweck wurde mit denselben RT-Produkten von Experimenten, in denen die gesteigerte IL-18BP Expression vorhanden war, die PCR für IL-18 durchgeführt. Als Ergebnis wurde offensichtlich, dass es durch Interferon- $\gamma$  weder zu einer Verminderung noch zu einem Anstieg der mRNA von IL-18 in den DLD-1 Zellen kommt (Abb. 3.20A). In separaten

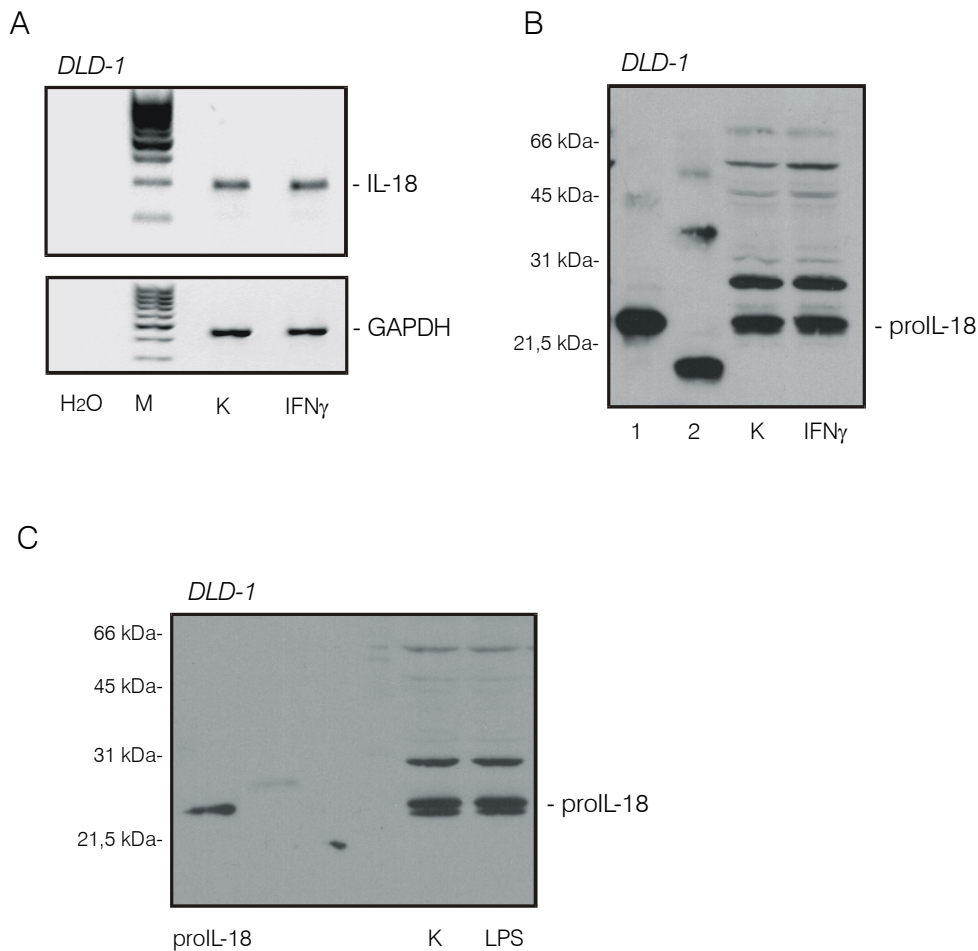


Abb. 3.20: Keine Anhaltspunkte für eine Regulation von IL-18 in DLD-1 Zellen. (A) DLD-1 Zellen wurden für 20 Stunden mit Interferon- $\gamma$  (40 ng/ml) stimuliert und danach auf Veränderungen des Gehalts an IL-18 mRNA untersucht (n = 3). K = unstimulierte Kontrollzellen. H<sub>2</sub>O = Negativkontrolle. M = Marker. (B) Proteinlysate von Interferon- $\gamma$  stimulierten DLD-1 Zellen wurden in IL-18 Western Blots analysiert. Auch hier waren keine reproduzierbaren Unterschiede im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen erkennbar (n = 3). Positivkontrollen: 1 = rekombinantes proIL-18. 2 = rekombinantes reifes IL-18. (C) In 4 unabhängigen Experimenten mit verschiedener Laufzeit (17 h, 24 h, 24 h, 27 h) wurden DLD-1 Zellen mit LPS (10  $\mu$ g/ml) stimuliert und wiederum die Proteinlysate im IL-18 Western Blot untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Experimenten wurde die IL-18 Proteinexpression in unstimulierten und Interferon- $\gamma$  aktivierten DLD-1 Zellen durch Western Blot Analyse untersucht. Auch hier scheint Interferon- $\gamma$  keine greifbaren Auswirkungen auf die IL-18 Bildung zu haben (Abb. 3.20B): Einerseits trat kein relativer Anstieg der proIL-18 Bande in den Interferon- $\gamma$  exponierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen auf. Andererseits trat auch keine Abnahme des intrazellulären proIL-18 Gehalts unter Interferon- $\gamma$  auf. Diese hätte als der Ausdruck einer gesteigerten Umwandlung von proIL-18 in die aktive Wirkform des reifen IL-18 interpretiert werden können. Der gleichzeitige Befund, dass in den Interferon- $\gamma$  behandelten Zellen intrazellulär kein reifes IL-18 detektiert werden konnte, hätte gut mit der Vorstellung vereinbart werden können, dass letzteres umgehend aus den Zellen ausgeschleust wird. In diesem

Zusammenhang muss indessen angemerkt werden, dass es speziell für Kolonkarzinomzellen *in vitro* zweifelhaft ist, ob sie überhaupt aktives IL-18 freisetzen können [Dr. Heiko Mühl, unveröffentlichte Ergebnisse].

Wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, ist LPS in Mesangiumzellen, nicht aber in DLD-1 Zellen, ein Induktor der IL-18BP Genexpression. Außerdem ist LPS als ein Reiz für die Freisetzung von IL-18 *in vivo* beschrieben worden (siehe Kapitel 1). Diese Beziehungen von LPS zum IL-18/IL-18BP-System waren Grund genug, seinen möglichen Einfluss auf den intrazellulären IL-18 Gehalt in DLD-1 Zellen zu untersuchen. Die Abbildung 3.20C zeigt, dass es nach LPS Stimulation zu keinen Veränderungen, d. h. weder einer Zu- noch einer Abnahme, der proIL-18 Bande kam.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden noch einer Reihe anderer Faktoren auf eine mögliche Beziehung zur IL-18 Genexpression getestet, die aber allesamt nur negative Befunde lieferten (nicht abgebildet):

Da beispielsweise eine Aktivierung des Fas/FasL-Systems als Stimulus für die IL-18 Freisetzung in Makrophagen beschrieben worden ist, wurden DLD-1 Zellen mit dem Fas aktivierenden Antikörper DX2 behandelt. Im Rahmen dessen ergaben Western Blot Untersuchungen keine Veränderungen in Bezug auf den IL-18 Gehalt der Zellen.

Aufgrund der Bedeutung die IL-18 in der Tumorabwehr spielt, wurde auch in mehreren Experimenten untersucht, ob Zytostatika neben ihrer bekannten Pharmakodynamik auch einen spezifischen Einfluss auf den proIL-18 Gehalt der DLD-1 Karzinomzellen besitzen, wobei sich diese Hypothese nicht bewahrheitete. Zu den getesteten Zytostatika zählten 5-Fluorouracil, Cladribin und Etoposid.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zellen mit der Fähigkeit zur Expression von Interleukin-18-Bindungsprotein

Nachdem bereits bekannt war, dass IL-18BP mRNA in verschiedenen menschlichen Organen vorkommt, konnten in den Experimenten der vorliegenden Dissertation zum ersten Mal einzelne Zelltypen ermittelt werden, die dieses immunmodulatorische Protein exprimieren. Es ist festzuhalten, dass in allen untersuchten Zellen konstitutiv geringe Spiegel mRNA für IL-18BP gefunden wurden, wobei es sich um die Isoform a handelte. Letzteres deckt sich mit Ergebnissen von *Novick et al.*, wonach IL-18BP<sub>a</sub> bei der Analyse von cDNA-Bibliotheken die mit Abstand häufigste Isoform darstellte [191].

Bemerkenswert ist die Universalität der Expression von IL-18BP in sehr verschiedenen Zellen. So scheinen sowohl Immunzellen und Nicht-Immunzellen bzw. primäre Zellen genauso wie „entartete“ Zelllinien zur Produktion von IL-18BP fähig zu sein. Wie mittlerweile in weiterführenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, beschränkt sich dabei das Spektrum der IL-18BP exprimierenden Zellen nicht allein auf die Zelltypen, die in dieser Dissertation Gegenstand der Untersuchungen waren. Neben der epithelialen Kolonkarzinom-Zelllinie DLD-1 konnte die Produktion und Freisetzung von IL-18BP auch für weitere Kolonkarzinom-Zelllinien, namentlich LoVo, Caco-2 und HCT116 Zellen, bewiesen werden [244]. Auch in *Ex-vivo*-Kulturen von endoskopisch erhaltenen Biopsien der gesunden Kolonschleimhaut findet in gleicher Weise eine IL-18BP Genexpression statt [244]. Diese übereinstimmenden Befunde legen nahe, dass DLD-1 Zellen nicht nur als ein zelluläres Modell des Kolonkarzinoms anzusehen sind. Vielmehr zeigen sie die Relevanz der Versuche mit DLD-1 Zellen auch bezüglich der Verhältnisse am nicht-malignen intestinalen Epithel auf.

Weiterhin können auch andere humane Epithelien IL-18BP exprimieren, wie die Ergebnisse von HaCaT Keratinozyten, von epithelialen WISH Zellen und von Endometriumzellen verdeutlichen [244-247]. Ferner ist die Produktion von IL-18BP für hepatozelluläre Karzinomzellen (Hep G2) beschrieben worden [247].

Dass Zellen mit mesodermalem Ursprung ebenso IL-18BP exprimieren, bewahrheitete sich in dieser Dissertation bereits am Beispiel von Mesangiumzellen und Fibroblasten. Mittlerweile liegen ähnliche Ergebnisse auch für Synoviozyten und Endothelzellen vor [248, 249].

Schließlich konnte in dieser Dissertation ebenfalls die Expression von IL-18BP in Immunzellen, d. h. in PBMCs und der monozytischen Zelllinie U937, nachgewiesen werden. Vor kurzem haben die Arbeitsgruppen von *Hurgin et al.*, *Veenstra et al.* und *Corbaz et al.* diese Ergebnisse bestätigt, indem sie über eine Expression von IL-18BP in U937 Zellen, Monozyten / Makrophagen und PBMCs berichten [247, 249, 250].

Insgesamt spricht alles dafür, dass eine Produktion von IL-18BP durch eine Vielzahl von Zellen stattfindet. Da es sich bei IL-18BP noch um einen sehr jungen Forschungsgegenstand handelt, kann außerdem angenommen werden, dass die Liste der IL-18BP freisetzenden

Zellen sich in Zukunft noch weiter verlängern wird. Die ubiquitäre IL-18BP Genexpression kann indessen als Beleg dafür herangezogen werden, welche Bedeutung diesem Protein bzw. seinem Gegenspieler IL-18 bei immunologischen Vorgängen zugeordnet werden kann. Auf der anderen Seite legt die lokale Ausrichtung der IL-18BP Freisetzung nahe, dass IL-18 durch seinen Antagonisten im Mikromilieu örtlich begrenzter Infektionen oder Entzündungen neutralisiert werden kann.

### 4.2 Regulation von IL-18BP durch Interferon- $\gamma$ : Die Entdeckung eines neuen negativen Rückkopplungsmechanismus

Mit den im Rahmen dieser Promotionsarbeit veröffentlichten Ergebnissen sind zum ersten Mal Daten zusammengetragen worden, die belegen, dass IL-18BP nicht nur wie vorher beschrieben konstitutiv exprimiert wird, sondern dass seine Produktion und Freisetzung induzierbar ist. In allen untersuchten Nicht-Immunzellen dieser Arbeit, d. h. in den DLD-1 Zellen, Mesangiumzellen und Fibroblasten, induziert Interferon- $\gamma$  reproduzierbar und stark die Genexpression von IL-18BP. Zusätzlich zu dieser Promotionsarbeit haben inzwischen auch andere Arbeitsgruppen die Regulierbarkeit von IL-18BP durch Interferon- $\gamma$  bestätigen können [247, 249, 250].

Wie mittels Western Blot am Beispiel der DLD-1 Zellen gezeigt werden konnte, folgt dem Anstieg der IL-18BP mRNA auch die Produktion und Freisetzung des Proteins in die Umgebung der Zellen. Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe brachten ans Licht, dass die Überstände der DLD-1 Zellen nach Behandlung mit Interferon- $\gamma$  tatsächlich in einem Bioassay eine überzeugende signifikante Hemmwirkung auf die durch IL-12/IL-18 vermittelte Interferon- $\gamma$  Produktion von PBMCs ausüben [244]. Dieser Befund lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Neutralisation des IL-18 durch das von den DLD-1 Zellen freigesetzte IL-18BP zurückführen und spricht für die vorhandene biologische Aktivität des endogenen IL-18BP.

In dieser Dissertation stellte sich die Reaktion von Nicht-Immunzellen auf Interferon- $\gamma$  *in puncto* IL-18BP Genexpression als ein sequentieller Ablauf dar, bei dem mehrere Stunden nach Exposition mit Interferon- $\gamma$  zuerst ein Anstieg der mRNA für IL-18BP auftrat, der bei voller Ausprägung den 20 – 30fachen Wert des basalen Spiegels besaß. Später, d. h. nach einer „lag-phase“ von 16 Stunden, konnte sezerniertes IL-18BP in den Überständen der Zellen nachgewiesen werden, wobei mit weiter fortschreitender Zeit eine Anreicherung des Bindungsproteins zu beobachten war. Natürlich stellt sich die Frage, welche intrazellulären Mechanismen der Signaltransduktion zwischen der Bindung von Interferon- $\gamma$  an seinen membranständigen Rezeptor und der Ausschüttung von IL-18BP liegen. Es konnte in der hier vorgelegten Arbeit lediglich in einzelnen Experimenten gezeigt werden, dass der Tyrosinkinase Inhibitor Genistein, der p38 MAPK Inhibitor SB203580 und dBcAMP ohne hemmenden Effekt auf die Interferon- $\gamma$  induzierte IL-18BP Genexpression blieben.

Von weitaus größerer Aussagekraft ist die mittlerweile von *Hurgin et al.* durchgeführte Studie über die Promotorregion des IL-18BP Gens [247]: Zuerst einmal wurde darin der Effekt von Interferon- $\gamma$  auf die IL-18BP Genexpression und Freisetzung bestätigt. Als Nächstes konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der IL-18BP mRNA durch Actinomycin D inhibierbar ist, also hochwahrscheinlich auf einer gesteigerten Transkription beruht. Darüber hinaus war in Luciferase Assays bei Stimulation mit Interferon- $\gamma$  nach 24 Stunden eine 33fache und nach 48 Stunden eine 88fache Steigerung der Aktivität des IL-18BP Promotors auslösbar. Schließlich konnte für die Transkriptionsfaktoren CCAAT / enhancer binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) und Interferon-Regulator-Faktor-1 (IRF-1) eine Bindung an den IL-18BP Promotor nachgewiesen werden. Während C/EBP $\beta$  von vornherein konstitutiv exprimiert und an die Promotorregion gebunden war, bewirkte erst die Interferon- $\gamma$  Behandlung der verwendeten Hep G2 Zellen eine messbare Genexpression des IRF-1, welcher nach seiner Translation in den Nucleus der Zellen translozierte und nun seinerseits zusammen mit C/EBP $\beta$  den Promotor von IL-18BP aktivierte. Das für eine gesteigerte Genexpression von IL-18BP zuerst eine *De-novo*-Synthese eines anderen Proteins erforderlich ist, fand sich auch dadurch bestätigt, dass die Vermehrung der mRNA für IL-18BP nach Interferon- $\gamma$  durch den Translationshemmer Cycloheximid unterdrückt wurde. Die Beteiligung von IRF-1 an der Genexpression von IL-18BP wird durch Ergebnisse anhand von IRF-1<sup>-/-</sup> Knock-out-Mäusen unterstrichen. Diese Tiere zeichnen sich sowohl durch stark verringerte konstitutive als auch induzierbare IL-18BP mRNA Spiegel in ihrer Leber aus. Interessanterweise war aber eine signifikante Induktion der Genexpression immer noch möglich [251]. Weiterhin zeigte sich im Vergleich zu Wildtyp Mäusen das konstitutiv zirkulierende IL-18BP im Serum bis unterhalb des Detektionslimits erniedrigt [247]. Nach Injektion von Interferon- $\gamma$  kam es zwar auch in IRF-1<sup>-/-</sup> Mäusen zu einem Anstieg von IL-18BP, die gemessenen Konzentrationen waren jedoch etwa 30fach niedriger als bei der Kontrollgruppe von Wildtyp Mäusen. Mit anderen Worten ist IRF-1 ein wichtiges Element in der Geninduktion von IL-18BP durch Interferon- $\gamma$ , aber auch bei vollständigem Ausfall von IRF-1 ist noch eine eingeschränkte Genexpression bzw. Induktion möglich. Von Bedeutung scheint auch, dass zuerst eine *De-novo*-Synthese von IRF-1 erfolgen muss, was u. a. zu einer gewissen Latenz in der Freisetzung von IL-18BP führt. Es liegt somit der Schluss nahe, dass andere schnellere für Interferon- $\gamma$  bekannte Signaltransduktionswege wie der Januskinase-STAT Signalweg für die Genexpression von IL-18BP keine Rolle spielen [247]. Allerdings sind auf diesem Gebiet in Zukunft zweifellos noch weitere Studien erforderlich, um ein vollständiges Bild der Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren, welche in die Regulation von IL-18BP eingreifen, zu erlangen.

Wie im vorangehenden Abschnitt ausgeführt, ist bislang für eine recht vielfältige Auswahl von unterschiedlichen Zelltypen die Fähigkeit der IL-18BP Expression nachgewiesen worden. Gleichermäßen zeichnet sich ab, dass die Induktion von IL-18BP durch Interferon- $\gamma$  ebenfalls ein universelles Phänomen darstellt, das für viele Zellen Gültigkeit besitzt. Neben den Mesangiumzellen, DLD-1 Kolonkarzinomzellen und Fibroblasten, welche die Forschungsobjekte dieser Dissertation darstellten, ist bis heute auch für HaCaT Keratinozyten, WISH Zellen, Hep G2 Leberkarzinomzellen, Synoviozyten, HUVEC Endothelzellen und für eine Reihe anderer Kolonkarzinomzellen eine gesteigerte IL-18BP Expression nach Interferon- $\gamma$  be-



schrieben worden [244, 245, 247-249]. Eine andere Frage ist es hingegen, ob IL-18BP auch in Immunzellen in derselben Weise reguliert wird, wie es bei Nicht-Immunzellen der Fall ist. Immerhin berichten mehrere Autoren über eine signifikante Zunahme der IL-18BP Genexpression in Monozyten / Makrophagen nach Interferon- $\gamma$  Behandlung [247, 250]. Auf der anderen Seite besitzt Interferon- $\gamma$  in undifferenzierten monozytischen U937 Zellen keinen Effekt bezüglich der IL-18BP Freisetzung, es sei denn die Zellen werden vorher mit Phorbol-12-myristat-13-acetat zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenziert [247]. Bei eingehender Untersuchung von PBMCs stellte sich heraus, dass es auch hier vornehmlich die Fraktion der Monozyten und nicht die NK- oder T-Zellen sind, die nach Interferon- $\gamma$  Stimulation die hauptsächliche Quelle von IL-18BP darstellen [247, 249]. Insgesamt sprechen aber alle bisher verfügbaren Daten dafür, dass der relative Anstieg der Interferon- $\gamma$  induzierten IL-18BP Freisetzung in Immunzellen deutlich moderater ausfällt als in ortsständigen Nicht-Immunzellen. So wurde zuletzt mittels ELISA für die Stimulation von PBMCs mit Interferon- $\gamma$  nach 48 Stunden circa eine Verdopplung der IL-18BP Freisetzung festgestellt [247, 249]. Bei U937 Zellen und aufgereinigten Monozyten / Makrophagen fanden die gleichen Autoren jeweils 4 – 5fache Anstiege. Im Vergleich dazu liegt für Nicht-Immunzellen die relative Steigerung der IL-18BP Freisetzung nach Interferon- $\gamma$  schätzungsweise etwa eine Zehnerpotenz höher. Es ist allerdings festzustellen, dass im Vergleich zu Nicht-Immunzellen (z. B. DLD-1 Zellen) die basale IL-18BP Expression in humanen PBMCs / Monozyten deutlich höher ist [Dr. Heiko Mühl, unveröffentlichte Ergebnisse]. Letzteres könnte auch die basalen Spiegel von IL-18BP (circa 2 ng/ml) im Serum gesunder Probanden erklären [252].

Eine lokale oder systemische Entzündungsreaktion beginnt zuerst mit dem komplexen Anschalten aktivierender sich zum Teil positiv verstärkender Immunsequenzen. Dabei spielen proinflammatorische Zytokine eine Schlüsselrolle. Die somit in Gang gebrachten Mechanismen münden schließlich in der Aktivierung der zellulären und humoralen Effektorsysteme des Immunsystems. Im Idealfall gelingt diesen Effektorsystemen am Ende die Beseitigung der schädigenden Noxe (z. B. Bakterium, Virus), welche die Ursache der Entzündungsreaktion war. Für die Rückkehr in den Normalzustand genauso wie für die rechtzeitige Bremsung der „entfesselten immunologischen Kräfte“ bedarf es einer Reihe von Regulationsprozessen unter Einbeziehung von Elementen mit antientzündlichem Charakter.

Diese allgemeinen theoretischen Überlegungen finden einen Teil ihrer Realisierung im System der beiden Gegenspieler IL-18 und IL-18BP, die somit ein anschauliches Beispiel für das harmonische Ineinandergreifen stimulierender und inhibierender immunologischer Faktoren sind (siehe Abb. 4.1): Am Anfang steht die Freisetzung von aktivem IL-18 anhand der Spaltung des bereits präformierten proIL-18, z. B. in ortsständigen Nicht-Immunzellen der Haut oder der Schleimhäute. Diese Zellen kommen aufgrund ihrer exponierten Lokalisation zur Körperaußenwelt oftmals als erste mit mikrobiellen Produkten einer sich anbahnenden Infektion in Kontakt. Eine ungefähre Vorstellung über die zeitliche Dimension der IL-18 Freisetzung vermitteln Experimente bei denen präkonditionierte Mäuse mit LPS injiziert wurden. Der Höhepunkt der systemischen IL-18 Konzentrationen lag in diesem Modell bei 2 Stunden nach der Injektion mit LPS [31]. Im Zusammenspiel mit vielen anderen frühen

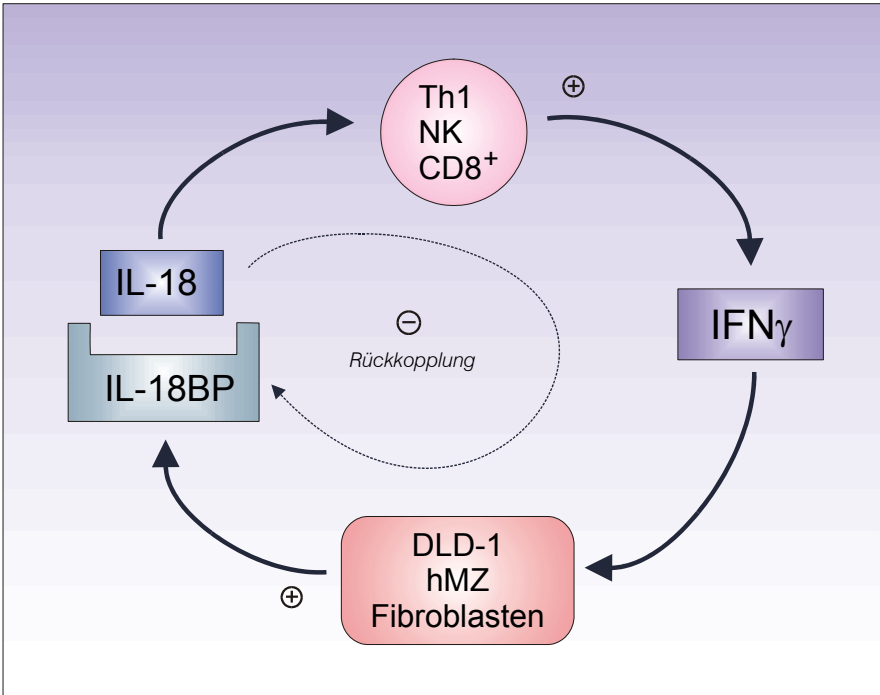


Abb. 4.1: Die Entdeckung eines neuen negativen Rückkopplungsmechanismus. Am Anfang einer Immunaktivierung wird aktives IL-18 durch Spaltung von proIL-18 freigesetzt. Zusammen mit anderen Faktoren bewirkt IL-18 die Produktion von Interferon- $\gamma$  durch Immunzellen, d. h. CD4+ Th1-Zellen, NK-Zellen und CD8+ zytotoxische Zellen. Neben vielfältigen anderen Wirkungen induziert Interferon- $\gamma$  die Genexpression und Freisetzung von IL-18BP aus ortsständigen Nicht-Immunzellen. Dazu gehören epitheliale DLD-1 Kolonkarzinomzellen genauso wie humane Mesangiumzellen oder Fibroblasten. Im letzten Schritt der negativen Rückkopplung wird IL-18 durch das nun freigesetzte IL-18BP neutralisiert und die Immunaktivierung limitiert.

proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen begünstigt das freigesetzte IL-18 die verstärkte Migration von Leukozyten in Richtung auf den sich bildenden Entzündungsherd. Dabei verändern die Leukozyten ihre Rezeptorausstattung und armieren sich durch verstärkte Expression der Rezeptoren für IL-18. Diese Hochregulation des IL-18R wird durch das Th1-Zytokin IL-12 vermittelt. Unter Anwesenheit angemessener Kostimuli (IL-12, TNF $\alpha$ , gleichzeitige T-Zell-Rezeptor Aktivierung u. a.) kann IL-18 nunmehr in NK-Zellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen und CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen die Produktion von Interferon- $\gamma$  bewirken. Im weiteren Verlauf initiiert das freigesetzte Interferon- $\gamma$  nicht zuletzt in den ortsständigen Nicht-Immunzellen am Entzündungsort eine komplexes Abwehrprogramm. Gleichzeitig signalisiert Interferon- $\gamma$  den ortsständigen Zellen aber auch die Anwesenheit von Immunzellen, d. h. deren erfolgreiche Rekrutierung an den Entzündungsort. Die aktivierende und modulierende Funktion von IL-18 ist somit erfolgreich eingeleitet worden. Ein uneingeschränkt fortgesetztes Wirken hätte eher nachteilige Konsequenzen für den Organismus im Sinne einer Überaktivität des Immunsystems, wie bei Autoimmunkrankheiten zu beobachten ist. Es sei auch daran erinnert, dass die experimentelle Injektion von IL-12 plus IL-18 in vorher gesunden Mäusen letal toxische Effekte hervorrufen kann [146]. Um möglichst zu verhindern, dass dergleichen unter natürlichen Bedingungen abläuft, reagieren die ortsständigen Nicht-Immunzellen wie z.

B. Darmepithelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten oder Mesangiumzellen auf Interferon- $\gamma$  mit einer vielfach gesteigerten Genexpression von IL-18BP. Dieses gelangt umgehend nach seiner Synthese über den Sekretionsweg des Golgi-Apparats in die Umgebung der Zellen. Dort neutralisiert IL-18BP die Wirkungen von IL-18, indem es unterbindet, dass letzteres weiterhin an seinen zellständigen Rezeptor binden kann. Erwähnenswerterweise wird nur das reife aktive IL-18 durch IL-18BP gebunden, während IL-18BP mit der Vorstufe proIL-18 nicht interagiert [193]. Interessant ist auch, dass der negativ rückkoppelnde Effekt erst mit einer gewissen Latenz eintritt, weil der für die IL-18BP Expression wichtige Transkriptionsfaktor IRF-1 zuerst selbst *de novo* synthetisiert werden muss. Dies schafft ein ausreichend langes Zeitintervall, damit keine vorzeitige Terminierung des IL-18 Signals erfolgt. Zweitens wird so durch IRF-1 eine protrahierte Dauer der IL-18BP Produktion erreicht, die vermutlich erst durch die Degradation von IRF-1 wieder unterbrochen wird, im Gegensatz zu Signaltransduktionskaskaden die über Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung ihrer Komponenten gesteuert sind. In der Tat wird auch nach experimenteller Unterbrechung des Interferon- $\gamma$  Signals durch Wegwaschen aus den Zellkulturen in den folgenden 48 Stunden noch ausreichend IL-18BP freigesetzt, um in einem konsekutiven Bioassay IL-18 zu antagonisieren [244].

Natürlich ist der oben so dargestellte zeitliche Verlauf der IL-18/IL-18BP-Rückkopplungsschleife lediglich eine idealisierte Vorstellung und es ist anzunehmen, dass bei chronischen Entzündungsprozessen alle Teilsequenzen schließlich unsynchron nebeneinander ablaufen und somit IL-18, Interferon- $\gamma$  und IL-18BP in ein Konzentrationsverhältnis zueinander treten, welches für den weiteren Verlauf richtungsbestimmend wird.

Als ein wichtiger Punkt ist festzuhalten, dass die Ergebnisse dieser Dissertation keinerlei Anhalt dafür geben, dass Interferon- $\gamma$  eine gleichgerichtete Regulation von IL-18BP und IL-18 bewirkt, bei der durch eine gleichzeitig gesteigerte IL-18 Produktion der Nettoeffekt der negativen Rückkopplung mittels IL-18BP gemindert würde. Eine solche Konstellation der Koregulation wäre sinnvoll, könnte man davon ausgehen, dass IL-18BP nicht nur eine Neutralisation, sondern durch seine Bindung an IL-18 auch eine Stabilisierungs- und Speicherfunktion *in puncto* IL-18 ausübt. Solche Phänomene sind zwar für IL-4 bzw. TNF $\alpha$  und ihre jeweiligen löslichen Zytokinrezeptoren beschrieben, allerdings für IL-18 / IL-18BP verneint worden [191, 204, 205]. In Wirklichkeit wurde denn auch der proIL-18 Gehalt der DLD-1 Zellen weder durch Interferon- $\gamma$  noch durch LPS verändert. Ein noch eindrücklicheres Beispiel bilden die Ergebnisse der humanen Mesangiumzellen, welche anders als epitheliale Zellen überhaupt kein IL-18 exprimieren, sondern ausschließlich dessen Gegenspieler IL-18BP.

Bei Betrachtung des negativen Feedback über die Stationen IL-18, Interferon- $\gamma$  und IL-18BP sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass Interferon- $\gamma$  über die gesteigerte Freisetzung von IL-18BP letztendlich nicht nur seine eigene Konzentration limitiert, sondern dass ebenso die Interferon- $\gamma$  unabhängigen Wirkungen von IL-18 begrenzt werden. Andererseits beeinflussen selbstverständlich nicht nur IL-18, sondern alle Faktoren welche die Freisetzung von Interferon- $\gamma$  steigern können indirekt auch den Anstieg von IL-18BP. Es handelt sich bei dem hier aufgedeckten negativen Feedback also mitnichten um einen geschlossenen Regelkreis. Vielmehr ist die Verschaltung der beiden Zytokine IL-18 und Interferon- $\gamma$  mit IL-18BP von

außen modulierbar, wobei anscheinend auch andere proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-6 Bedeutung haben können (siehe nächster Abschnitt).

Insbesondere noch einmal hervorzuheben ist, dass der hier skizzierte Rückkopplungsmechanismus demonstriert wie bei Entzündungen eine parakrine Kommunikation zwischen Leukozyten und Nicht-Immunzellen, d. h. zwischen sehr verschiedenen Zelltypen, stattfinden kann. Experimentell konnte dieser Sachverhalt anhand der indirekten Kokulturen zwischen PBMCs und ortsständigen Zellen dargestellt werden. Allem Anschein nach spielt demgegenüber eine autokrine Rückkopplung keine herausragende Rolle, da die Interferon- $\gamma$  produzierenden NK-Zellen und T-Zellen selber auf dieses Zytokin nicht mit einer nennenswerten IL-18BP Freisetzung reagieren [250].

Außer bei Entzündungen auf dem Boden einer Infektion oder mit einer autoimmunologischen Ätiologie besitzt IL-18 und damit auch sein Kontrahent IL-18BP eine relevante Bedeutung in der Tumorbilogie. Obwohl die Ergebnisse insgesamt nicht einheitlich sind, liegen dennoch viele tierexperimentelle Arbeiten über die Anti-Tumor-Wirkungen von IL-18 vor [133-136, 139, 141, 142, 148, 253]. In der Konsequenz kann für IL-18BP bei der Tumorprogression *per se* ein fördernder Einfluss angenommen werden und eine Verschiebung des Gleichgewichts beider Proteine zu seinen Gunsten mag mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf einhergehen. Nicht unwichtig ist in diesem Zusammenhang, dass die entarteten Tumorzellen (z. B. DLD-1 Zellen) weiterhin IL-18BP in der Art einer hemmenden Rückkopplung freisetzen können. Somit ist den Tumorzellen die Möglichkeit gegeben lokal hemmend auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu wirken und dadurch ihrer eigenen Vernichtung entgegenzutreten. Wenn Kolonkarzinomzellen *in vitro* mit Interferon- $\gamma$  stimuliert und 24 Stunden später Mäusen i. v. injiziert wurden, entstand in der Tat eine höhere Zahl an Lungenmetastasen als im Vergleich zu unbehandelten Zellen [254]. Dieser Befund ließe sich leicht mit einer gesteigerten IL-18BP Freisetzung durch die vorbehandelten Tumorzellen und einer konsekutiv verstärkten Imbalance des IL-18/IL-18BP-Systems erklären.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die bei dieser Promotionsarbeit anhand von *In-vitro*-Zellkulturen erhobenen Daten auf die Verhältnisse *in vivo* übertragbar sind. Zum Beispiel wurden jüngst gesunde Mäuse mit Interferon- $\gamma$  i. p. injiziert und 24 Stunden später IL-18BP per ELISA im Serum der Tiere gemessen. Hierbei zeigte sich IL-18BP erwartungsgemäß signifikant erhöht [247]. Unabhängig davon wurde mittels eines cDNA-Microarray-Systems über eine parallel erhöhte Expression von Interferon- $\gamma$  und IL-18BP in einem Mausmodell des fulminanten Leberversagens berichtet [255].

Bei einer anderen Untersuchung wurde im Rahmen einer Phase I Studie einigen Patienten mit fortgeschrittenem Krebsleiden rekombinantes IL-12 i. v. appliziert. In den anschließenden 12 und 24 Stunden nach der IL-12 Injektion kam es in wechselndem Ausmaß zum Anstieg von Interferon- $\gamma$  und IL-18BP, was in erhöhten Serumkonzentrationen beider Faktoren seinen Niederschlag fand [250].

### 4.3 Einfluss von LPS und anderer Faktoren auf die Interleukin-18-Bindungsprotein Genexpression

Nach allen mittlerweile verfügbaren Daten erfolgt die Regulation von IL-18BP recht spezifisch, wenn auch nicht ausschließlich, durch Interferon- $\gamma$ . So genügte in den hier durchgeführten Versuchen mit humanen Mesangiumzellen der alleinige Kontakt mit LPS ebenfalls, um die Genexpression von IL-18BP anzuschalten. Im Einklang mit diesem Ergebnis, ist vor kurzem über eine Hochregulation der IL-18BP mRNA in Leberextrakten von Ratten nach LPS Injektion berichtet worden [256]. Diese Befunde verdeutlichen insbesondere, dass die vielfältigen Wirkungen von LPS auf menschliche Zellen nicht nur in einer Förderung der Freisetzung entzündungsfördernder Botenstoffe besteht, sondern dass gleichzeitig bereits antiinflammatorische Mechanismen angeschoben werden. So verursacht beispielsweise LPS auch nicht einzig allein eine Freisetzung des proinflammatorischen IL-1 $\beta$ , sondern induziert ebenfalls die Produktion dessen Antagonisten IL-1Ra [257-260].

Wie anzunehmen ist, liegt zwischen der Freisetzung von IL-18 und derjenigen von IL-18BP nach LPS Exposition eine Latenz von mehreren Stunden, da wie gesagt IL-18 nur enzymatisch aktiviert zu werden braucht, während IL-18BP *de novo* translatiert werden muss. Allerdings erfolgt wahrscheinlich die direkte Induktion von IL-18BP durch LPS schneller als es ansonsten mittels IL-18 möglich ist. Immerhin erfordert die negative Rückkopplungsschleife nach Freiwerden von IL-18 zuerst noch die Anwesenheit von Immunzellen und deren Synthese von Interferon- $\gamma$  bis es schließlich zur Induktion der Genexpression von IL-18BP kommt.

Die durch LPS verursachte exzessive Produktion proinflammatorischer Zytokine trägt wahrscheinlich mit zur Entstehung von Komplikationen einer gramnegativen Infektion bei. Als schwerwiegendste Komplikation ist dabei vor allem an den häufig letal ausgehenden septischen Schock zu denken. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint es in der Tat sehr sinnvoll, dass der Organismus möglichst frühzeitig auf LPS auch mit der Freisetzung entzündungshemmender Proteine wie IL-18BP reagiert, um die Aktivierung des Immunsystems unter Kontrolle zu halten. Durch solche Mechanismen wird möglicherweise das Risiko für die Entstehung einer Sepsis verringert.

Außer Interferon- $\gamma$  und LPS zeigte von den knapp 20 im Rahmen dieser Dissertation getesteten Faktoren keiner eine Wirkung auf die IL-18BP Genexpression. Insbesondere waren die beiden bedeutenden proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF $\alpha$  bei alleiniger Anwendung ohne einen Effekt, was für die Spezifität der IL-18BP Genregulation spricht. Inzwischen bestätigen auch andere Arbeitsgruppen die fehlende Wirkung dieser beiden Zytokine bezüglich der IL-18BP Expression [247, 248, 250]. Allerdings ist für Hep G2 Zellen berichtet worden, dass die Kombination von Interferon- $\gamma$  mit TNF $\alpha$  eine zusätzliche signifikante Steigerung der IL-18BP Freisetzung gegenüber der alleinigen Stimulation mit Interferon- $\gamma$  verursacht [247]. Da TNF $\alpha$  zugleich einen Kostimulus für die IL-18 induzierte Interferon- $\gamma$  Freisetzung aus NK- / T-Zellen darstellt, scheint es folglich an verschiedenen Stellen in das IL-

IL-18/IL-18BP-System einzugreifen. Im Übrigen scheint auch IL-6 die Wirkung von Interferon- $\gamma$  auf die IL-18BP Genexpression zu verstärken, während es alleine ebenfalls keinen Effekt besitzt [247]. Im Hinblick auf den im letzten Abschnitt ausführlich skizzierten hemmenden Rückkopplungsmechanismus ist es wichtig noch einmal festzuhalten, dass IL-18 und IL-12 selber keinen direkten Einfluss auf IL-18BP ausüben, eine Aussage die inzwischen mehrfach bekräftigt worden ist [247, 248]. Die einzige Substanz für die bis jetzt – in epithelialen Kolonkarzinomzellen – ein hemmender Effekt auf die Interferon- $\gamma$  induzierte IL-18BP Freisetzung erkannt worden ist, stellt interessanterweise die kurzkettige Fettsäure Butyrat dar [244]. Dies deutet darauf hin, dass die Protektion die Butyrat gegenüber der Entstehung von Kolonkarzinomen ausübt zumindest teilweise auf einer Verschiebung des IL-18/IL-18BP-Gleichgewichts in Richtung des tumorsuppressiven IL-18 bestehen könnte [261].

### 4.4 Veränderte Genexpression von Interleukin-18-Bindungsprotein bei Krankheiten

Eine Erkrankung die bekanntermaßen mit stark erhöhten Konzentrationen einer Vielzahl von Entzündungsproteinen bzw. Zytokinen einhergeht ist die Sepsis. Insbesondere lag bei einer Studie die kürzlich an 42 Patienten mit Sepsis durchgeführt wurde nicht nur eine Erhöhung von IL-18, sondern ebenfalls ein Anstieg von IL-18BP vor [252]. Während in der Kontrollgruppe von 107 gesunden Individuen mittlere IL-18 und IL-18BP Serumkonzentrationen von  $64 \pm 17$  pg/ml respektive  $2,15 \pm 0,15$  ng/ml bestanden, waren bei dem Kollektiv der septischen Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme ins Krankenhaus Serumwerte von  $1,5 \pm 0,4$  ng/ml für IL-18 und  $28,6 \pm 4,5$  ng/ml für IL-18BP vorhanden. Das entsprach einem 22fachen relativen Anstieg von IL-18 und einer 13fachen relativen Vervielfachung von IL-18BP. Obwohl in dieser Studie keine Serumwerte von Interferon- $\gamma$  bestimmt wurden, darf davon ausgegangen werden, dass sein Anstieg infolge der erhöhten IL-18 Spiegel ein wesentliches Verbindungsglied bezüglich der gleichsinnig erhöhten IL-18BP Werte darstellt. Des Weiteren dürfte in der Sepsis, sofern sie durch gramnegative Bakterien hervorgerufen ist, die direkte Induktion von IL-18BP durch LPS Bedeutung besitzen.

Obwohl die exakte Ätiologie des M. Crohn bislang nicht aufgeklärt werden konnte, gilt als gesichert, dass proinflammatorische Zytokine bei der Pathogenese dieser chronisch entzündlichen Darmkrankheit eine entscheidende Rolle spielen. Besonders IL-18 könnte bei der Dysregulation des Immunsystems zugunsten einer gesteigerten Th1-Antwort von Bedeutung sein. *De facto* findet sich in den Läsionen von M. Crohn Patienten sowohl eine erhöhte Expression von IL-18 als auch eine Erhöhung der von ihm induzierten Zytokine wie Interferon- $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  [154, 155, 262, 263]. Entsprechend den im Rahmen dieser Dissertation *in vitro* gewonnenen Erkenntnissen über die IL-18BP induzierende Wirkung von IL-18 bzw. Interferon- $\gamma$  sollte deshalb auch eine gesteigerte Genexpression von IL-18BP beim M. Crohn erwartet werden können. Tatsächlich ließ sich in aktiven Läsionen von Patienten mit

M. Crohn die verstärkte Expression von IL-18BP mittels Immunhistochemie nachweisen [249]. Gleichzeitig bestand in den Läsionen eine Erhöhung von IL-18 und es konnte der Komplex von IL-18/IL-18BP detektiert werden. Nichtsdestotrotz war weiterhin ungebundenes reifes IL-18 präsent, was auf eine nur unvollständige Neutralisation durch IL-18BP schließen lässt.

Eine andere chronische entzündliche Erkrankung für die eine mögliche Erhöhung der IL-18 und IL-18BP Serumspiegel bekannt geworden ist, stellt die Rheumatoide Arthritis dar [264]. Allerdings korrelierten in der zitierten Studie die Serumkonzentrationen von IL-18 und seinem Gegenspieler weder mit der klinischen Krankheitsaktivität noch mit dem Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie. Möglicherweise aufschlussreicher als Untersuchungen über die systemischen Serumspiegel von IL-18BP wäre allerdings die Gewinnung von Einblicken in die lokalen Verhältnisse des Synoviums der betroffenen Gelenke.

Eine andere Form der Polyarthritis mit zusätzlichen schweren Allgemeinsymptomen wie Fieber, Myalgien, Lymphadenopathie, Hauteffloreszenzen, Pleuritis, Perikarditis, Pneumonitis und Leberschädigung ist das Still-Syndrom im Erwachsenenalter. Ungleich mehr als bei der Rheumatoiden Arthritis besteht beim Still-Syndrom ein exzessives Vorkommen von IL-18, für das 600fach (!) höhere Konzentrationen im Serum als bei der Rheumatoiden Arthritis gemessen werden konnten [265]. In einem Bioassay zur Abklärung der IL-18 Aktivität besaßen die Seren von Patienten mit Still-Syndrom die Fähigkeit Interferon- $\gamma$  zu induzieren, jedoch war die Bioaktivität vielfach niedriger als nach den gemessenen IL-18 Konzentrationen erwartet werden konnte. Die Ursache dafür lag in dem Vorhandensein einer gleichzeitigen endogenen inhibitorischen Aktivität mit Blockade der IL-18 Rezeptorbindung, die aller Wahrscheinlichkeit nach durch IL-18BP hervorgerufen wurde und quantitativ in strenger Korrelation mit den gefundenen IL-18 Konzentrationen stand. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden von malignen hämatologischen Erkrankungen für die zum Teil stark erhöhte IL-18 Konzentrationen bei gleichzeitig nicht präsenter oder merklich eingeschränkter IL-18 Bioaktivität gemessen worden sind [266].

Bei einer Studie an 153 Patienten mit chronischen Leberkrankheiten verschiedener Ätiologie waren IL-18 und IL-18BP parallel gegenüber einer Kontrollgruppe gesunder Individuen erhöht und ihr Anstieg korrelierte positiv mit anderen Leberfunktions-, Entzündungsparametern und der Schwere der Erkrankung [267]. Auch bei der akuten Graft-versus-Host-Disease nach allogener Stammzelltransplantation ist eine synchrone Erhöhung der beiden Kontrahenten IL-18 und IL-18BP gefunden worden [268].

Es ist zu erwarten, dass in Zukunft weitere Berichte über die Induktion von IL-18BP bei den genannten und anderen Erkrankungen folgen werden. Diese Daten verdeutlichen, dass IL-18BP weniger als ein rein konstitutiv exprimiertes Protein, sondern vielmehr als ein regulierter Immunmodulator anzusehen ist. Auffällig zeigen die verschiedenen Studien die parallele Erhöhung von IL-18 und IL-18BP *in vivo*. Die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Erkenntnisse über die negative Rückkopplungsschleife unter Einbeziehung von Interferon- $\gamma$  bieten eine rationale Erklärung für diese Befunde.

### 4.5 Ausblick

#### *Welche Rolle kann IL-18BP bei der Therapie von Tumorerkrankungen spielen?*

Viele experimentelle Daten geben Zeugnis von den Anti-Tumor-Effekten des IL-18 [133-136, 139, 141, 142, 148, 253], so dass der therapeutische Einsatz dieses Zytokins als neues Tumor-Adjuvans vorgeschlagen worden ist. Jede wie auch immer geartete Applikation von IL-18 wird aber voraussichtlich von einer endogenen Hochregulation seines Gegenspielers IL-18BP gefolgt werden, die eine tachyphylaktische Wirkungseinschränkung von IL-18 zur Folge hat. In diesem Sinne wäre eine Unterdrückung und Aushebelung dieses Rückkopplungsmechanismus wünschenswert, was zum einen durch Antisense-Strategien mit dem Ziel einer Hemmung der IL-18BP Expression denkbar ist. Zum anderen konnten durch gerichtete Punktmutationen künstlich veränderte Formen von IL-18 entworfen werden, die sich *in vitro* durch IL-18BP nur noch eingeschränkt neutralisieren lassen und eine höhere biologische Aktivität aufweisen [269]. Mit der Verwendung eines dermaßen mutierten IL-18 sollte auch therapeutisch eine höhere Wirksamkeit erzielt werden können, wobei abzuwarten ist, ob möglicherweise dann auch verstärkte unerwünschte Nebenwirkungen in Erscheinung treten. Neben Beweisen für die tumorsuppressiven Eigenschaften von IL-18 gibt es allerdings ebenso Berichte, welche für IL-18 eine Förderung des Tumorwachstums belegen [137, 138, 270]. Zum Beispiel scheint eine durch IL-18 gesteigerte Genexpression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 die Anheftung von Melanomzellen an das Endothel in der Leber zu erleichtern und damit die Absiedelung von Tochtergeschwülsten zu begünstigen [138, 270]. Auch für andere IL-18 regulierte Gene wie Stickstoffmonoxid ist eine Förderung des Wachstums bei manchen Tumoren bekannt [69, 123, 271, 272]. Zusammengenommen könnte folglich in bestimmten Fällen eine Schwächung der IL-18 Aktivität therapeutisch sinnvoll sein. In Übereinstimmung mit dieser Betrachtungsweise konnte vor kurzem in einem murinen Tiermodell der Melanom-Metastasierung durch i. p. Injektion von IL-18BP die Anzahl und Größe von Lebermetastasen deutlich reduziert werden [273].

Letztendlich ist demnach die exakte Rolle von IL-18 in der Tumorbilogie noch nicht vollständig geklärt. Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse deuten darauf hin, dass sein Einfluss im Einzelfall unterschiedlich sein kann und von der Tumorart bzw. dem experimentellen Aufbau abhängt. Zweifellos ist IL-18BP als effektiver Gegenspieler von IL-18 ein neuer Parameter, der in die Überlegungen mit einbezogen werden muss. Es bleibt abzuwarten, in welchen konkreten Fällen maligner Erkrankungen eine Schwächung oder eine Verstärkung von IL-18BP klinischen Nutzen bringen könnte.

#### *Gibt es potentielle Anwendungsmöglichkeiten von IL-18BP bei Infektionskrankheiten?*

Unbestreitbar ist IL-18BP dank seiner hohen Affinität zu IL-18 funktionell quasi äquivalent zu neutralisierenden Anti-IL-18-Antikörpern, bietet aber gegenüber diesen den mutmaßlichen Vorteil einer besseren Verträglichkeit. Als ein körpereigenes Protein muss bei IL-18BP in der Tat nur mit geringen antigenen und allergenen Eigenschaften gerechnet werden. Wie bereits erwähnt, konnte mittlerweile für eine Reihe von Erkrankungen der Anstieg von IL-18BP belegt werden. Möglicherweise ist jedoch die endogene Produktion nicht ausreichend und eine



zusätzliche therapeutische Applikation von IL-18BP bei diesen Krankheiten vorteilhaft. Zum Beispiel konnte die Letalität bei Mäusen nach Verabreichung einer tödlichen Dosis von LPS ( $LD_{50}$ ) drastisch reduziert werden, wenn vorher IL-18BP in der Darreichungsform IL-18BP-Fc gegeben wurde [274]. Bei IL-18BP-Fc handelt es sich um ein Fusionsprotein aus IL-18BP und dem Fc-Teil von IgG1 mit u. a. dem Vorteil einer verlängerten Biostabilität. Neben einer Senkung der Sterblichkeit war durch IL-18BP-Fc eine starke Reduzierung des zirkulierenden Interferon- $\gamma$  zu verzeichnen, die auch auftrat, wenn das Fusionsprotein bis zu 6 Tagen vor dem LPS injiziert wurde. Darüber hinaus verhinderte IL-18BP-Fc das Auftreten der durch LPS induzierten Leberschädigung genauso wie die Hepatotoxizität nach Concanavalin A oder *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A. Obwohl diese Ergebnisse insgesamt eine Anwendung von IL-18BP bei der Sepsis möglich erscheinen lassen, sollte einschränkend bedacht werden, dass bisherige klinische Studien mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  neutralisierenden Strategien trotz vielversprechender tierexperimenteller Daten weitestgehend enttäuschend verlaufen sind [275]. Zur weiteren Ernüchterung ist für eine Subgruppe von Mäusen mit Sepsis sogar über einen signifikanten Anstieg der Letalität durch eine anschließende Therapie mit IL-18BP berichtet worden [168]. Bei dieser Subgruppe handelte es sich um ausschließlich diejenigen Mäuse mit relativ niedrigen IL-6 Spiegeln, was als ein günstiger prädiktiver Parameter für ein Überleben der Sepsis beschrieben wurde [276].

Eine andere Anwendungsmöglichkeit der IL-18BP Biologie könnte bei der Impfstoffentwicklung gegeben sein. Für mehrere Vertreter aus der Familie der Pockenviren ist bekannt, dass sie virale IL-18-Bindungsproteine als Virulenzfaktoren codieren. Bei der Deletionsmutante des *Vaccinia Virus* für sein IL-18BP zeigte sich in der Tat ein abgeschwächter Krankheitsverlauf und eine niedrigere Mortalität der infizierten Mäuse [198, 277]. Spekulativ könnte eine Deletion der viralen IL-18-Bindungsproteine beim *Molluscum contagiosum Virus* und anderen Viren ebenso zu abgeschwächten Virusstämmen führen, die unter Umständen als risikoarme Lebendimpfstoffe geeignet sein könnten.

### *Kann IL-18BP vor den Auswirkungen von Gefäßerkrankungen schützen?*

Eine Erkrankung deren inflammatorischer Charakter in den letzten Jahren zunehmend gewürdigt worden ist, ist die Atherosklerose [4]. Daher ist es nicht überraschend, dass die DNA-Plasmid gekoppelte Applikation des antiinflammatorischen IL-18BP in einem etablierten Mausmodell der Atherosklerose die Entwicklung von Gefäßplaques verlangsamte, und dass vor allem deren Zusammensetzung in Richtung der günstigeren stabilen atherosklerotischen Plaques verschoben werden konnte [278]. Außerdem wirkte sich eine Applikation von IL-18BP günstig auf die Gefäßneubildung nach Ischämie aus und verbesserte ebenfalls nach Ischämie die Kontraktilität der isolierten Vorhofmuskulatur [279, 280]. Somit scheint für die Zukunft eine weitere Prüfung des Nutzens der IL-18BP Anwendung bei gefäßdegenerativen Erkrankungen durchaus lohnenswert.

### *Ist IL-18BP ein neuer Hoffnungsträger für die Therapie der Rheumatoiden Arthritis und der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen?*

In den letzten Jahren konnte mit TNF $\alpha$ -neutralisierenden Therapiestrategien bei der Rheumatoiden Arthritis, den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und anderen Erkrankungen große Erfolge erzielt werden. Angesichts der offensichtlich vorhandenen Rolle die

auch IL-18 bei diesen Entzündungskrankheiten spielt, liegt die aussichtsreichste Indikation einer Therapie mit IL-18BP vermutlich auf diesem Gebiet. Bemerkenswerterweise lassen sich chemisch induzierte Kolitiden bei Mäusen durch rekombinantes humanes IL-18BP<sub>a</sub> oder ein IL-18BP-Fc Protein deutlich abschwächen [281, 282]. Diese Formen der Dickdarmentzündung sind anerkannte Tiermodelle für die Colitis ulcerosa und den M. Crohn des Menschen. Unter dem Therapieschema mit IL-18BP kam es auf molekularbiologischer Ebene zu einer geringeren Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Matrix-Metalloproteinasen. Histopathologisch fanden sich geringer ausgeprägte inflammatorische Veränderungen des Kolons und bei den behandelten Mäusen kam es im Unterschied zu den Tieren der Kontrollgruppe zu einem weniger dramatischen Körpergewichtsverlust. Zusammenfasst besitzt IL-18BP somit sehr potente entzündungshemmende und krankheitsmildernde Eigenschaften bei diesen Experimenten. Ähnlich ermutigend stellen sich die Ergebnisse bei Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis dar: Nach Gabe von IL-18BP wird der klinisch evaluierbare Score der Krankheitsaktivität signifikant gesenkt und das Fortschreiten der Arthritis verlangsamt [153, 283, 284]. In der späteren histologischen Bewertung war eine geringere Erosion bzw. Zerstörung von Gelenkknorpel und Knochen als bei Kontrolltieren vorhanden. Der verminderte Knorpelabbau drückte sich auch in erniedrigten Serumkonzentrationen von COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), einem Marker des Knorpelumsatzes, aus [153]. Außerdem wurden durch IL-18BP Administration andere proinflammatorische Zytokine, wie das zirkulierende IL-6 und die mRNA von Interferon- $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in den Gelenken reduziert [153, 283]. Zusammengenommen zeigt dies, dass die Einordnung von IL-18BP in die Gruppe der *Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs* gerechtfertigt ist. Da insgesamt nicht jeder Patient mit Rheumatoider Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen befriedigend auf eine Anti-TNF $\alpha$ -Therapie anspricht, besteht auch weiterhin die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Immunpharmaka. Diesbezüglich stimmen die Erkenntnisse, die innerhalb der wenigen vergangenen Jahre über IL-18BP gewonnen werden konnten, so optimistisch, dass eine Anwendung beim Menschen gerechtfertigt erscheint. In der Tat befindet sich rekombinantes IL-18BP bereits in Phase I der klinischen Erprobung zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis und des M. Crohn sowie in Phase II zur Therapie der Psoriasis [285]. Sollte sich der therapeutische Einsatz von IL-18BP bei autoimmunen Erkrankungen als wirksam erweisen, so muss selbstverständlich auch hierbei mit Nebenwirkungen gerechnet werden. Die einerseits gewünschten immunsuppressiven Eigenschaften von IL-18BP könnten gleichermaßen eine erhöhte Infektanfälligkeit begünstigen. So kann beispielsweise bei Therapie mit Anti-TNF $\alpha$ -Pharmaka von einem signifikanten Risiko bezüglich der Reaktivierung einer Tuberkulose ausgegangen werden [286, 287].

### *Welche Fragen über IL-18BP warten in der Zukunft noch auf ihre Beantwortung?*

Es kann konstatiert werden, dass das Wissen über die Biologie von IL-18BP seit seiner Erstbeschreibung im Jahr 1999 sprunghaft angestiegen ist.<sup>1</sup> Es liegt allerdings in der Natur aller Wissenschaften, dass jede einzelne Antwort zu der man gelangt gleich mehrere neue

---

<sup>1</sup> Bei Beginn der Experimente zu dieser Dissertation im Sommer 1999 fanden sich in der Literaturdatenbank PubMed lediglich 2 Artikel über IL-18BP. Im Oktober 2003 waren es bereits mehr als 50 Publikationen.

Fragen aufwirft. So wird noch einige Arbeit notwendig sein, bis ein komplettes Bild der Regulation der Genexpression von IL-18BP und sein Verhältnis im Wechselspiel mit IL-18 gezeichnet werden kann. Insbesondere bedarf es einer weiteren Charakterisierung der intrazellulären Signaltransduktionswege und der Funktionsweise des IL-18BP Promotors. Bislang ist auch nicht untersucht, was nach der Bindung von IL-18BP an IL-18 geschieht, d. h. inwiefern der Abbau und Turnover des Komplexes beider Proteine geregelt ist. Obwohl die Neutralisation von IL-18 durch IL-18BP sehr spezifisch ist, muss trotzdem die Möglichkeit geprüft werden, ob IL-18BP noch an andere Strukturen binden kann. In der Tat ist für eines der viralen IL-18-Bindungsproteine des *Molluscum contagiosum Virus* vor kurzem bekannt geworden, dass sein langes C-terminales Ende simultan zu IL-18 noch an Heparin und andere Glykosaminoglykane binden kann [288]. Diese Eigenschaft der Anheftung an Strukturen die im Allgemeinen auf der Oberfläche von Zellen sowie der extrazellulären Matrix vorhanden sind, beeinflusst höchstwahrscheinlich die Dynamiken der Gewebeverteilung. Spannend ist auch die Frage, welche Bedeutung den verschiedenen Isoformen von IL-18BP zukommt und ob vielleicht bei manchen Individuen ein verringertes Splicing von IL-18BP zugunsten der anderen Isoformen für Krankheiten prädisponiert. In dieser Hinsicht wäre es auch interessant Menschen mit einer Gendeletion für IL-18BP ausfindig zu machen und zu untersuchen, inwieweit sie dadurch für bestimmte Erkrankungen anfälliger oder resistenter sind. Mit ähnlichen Auswirkungen könnte bei anderen Menschen die Regulationsfähigkeit von IL-18BP verändert sein, z. B. durch eine fehlende Antwort gegenüber Interferon- $\gamma$ . Schon heute lässt sich feststellen, dass IL-18 und IL-18BP zwei einflussreiche Bausteine im Zusammenspiel aller Elemente des Immunsystems darstellen. Sicherlich wird sich unser Wissen über diese beiden Proteine in der Zukunft weiter vermehren und einige der heute noch offenen Fragen werden sich beantworten lassen. Es wird erfreulich sein diesen Fortschritt sowohl mitzuerleben, als auch an ihm beizutragen.

# 5 Zusammenfassung

Interleukin-18-Bindungsprotein (IL-18BP) ist ein erst kürzlich entdeckter Gegenspieler von Interleukin-18 (IL-18). Aufgrund der Eigenschaft von IL-18BP mit hoher Affinität an IL-18 zu binden, wird IL-18 neutralisiert und seine biologischen Wirkungen durch IL-18BP inhibiert. Das Zytokin IL-18 ist ein multifunktionseller Botenstoff des Immunsystems, dessen Aktivität bei der Entstehung von Entzündungen, der Abwehr von Infektionen und der Rückbildung von Tumoren beteiligt sein kann. Eine der bedeutendsten Wirkungen von IL-18 ist insbesondere seine Fähigkeit die Produktion und Freisetzung von Interferon- $\gamma$  durch T-Helfer Typ 1 (Th1) Zellen, Natürliche Killer (NK) Zellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische Zellen auszulösen.

Bislang war lediglich bekannt, dass es sich bei IL-18BP um ein konstitutiv exprimiertes und sezerniertes Protein handelt. Die Zielsetzung dieser Promotionsarbeit war es zu untersuchen, ob eine Regulation der Genexpression von IL-18BP in Nicht-Immunzellen stattfindet. Dazu wurde im ersten Schritt eine semiquantitative RT-PCR Methode etabliert, mit Hilfe derer eine schwache konstitutive Expression der IL-18BP mRNA in Zellkulturen von humanen renalen Mesangiumzellen, epithelialen DLD-1 Kolonkarzinomzellen und Fibroblasten nachgewiesen wurde. Im Folgenden konnte als wesentliches Ergebnis festgestellt werden, dass eine Induktion der Genexpression von IL-18BP durch Interferon- $\gamma$  erfolgt. Mit RNase Protection Assays wurden nach Interferon- $\gamma$  Exposition 20 – 30fache relative Steigerungen der IL-18BP mRNA detektiert. In humanen Mesangiumzellen führte außerdem bakterielles Lipopolysaccharid zum Anstieg der IL-18BP Genexpression. Im zweiten Teil der Untersuchungen ließ sich unter Verwendung eines eigens hergestellten polyklonalen Antiserums nachweisen, dass durch Interferon- $\gamma$  auch eine starke Vervielfachung der Freisetzung bzw. Sekretion von IL-18BP stattfindet. Weiterhin wurden Kokulturen von IL-12/IL18 aktivierten humanen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) mit entweder Mesangiumzellen oder DLD-1 Zellen durchgeführt. In diesen Kokulturen bewirkte die mittels ELISA gemessene Freisetzung von endogenem Interferon- $\gamma$  durch die PBMCs ebenfalls eine Induktion der Genexpression von IL-18BP in den Mesangiumzellen und DLD-1 Zellen. Darüber hinaus wurde in anderen Experimenten untersucht, ob die Regulation von IL-18BP gleichzeitig von Änderungen im Gehalt an IL-18 begleitet wird. Während in den humanen Mesangiumzellen kein IL-18 exprimiert wurde, konnte in den DLD-1 Zellen konstitutives proIL-18 detektiert werden. Jedoch hatte Interferon- $\gamma$  in DLD-1 Zellen keinen Einfluss auf die IL-18 Expression.

Die hier zusammengetragenen Resultate belegen zum ersten Mal, dass es sich bei IL-18BP nicht nur um ein konstitutiv exprimiertes Protein, sondern vielmehr um einen spezifisch regulierten Immunmodulator handelt. Die Induktion der Freisetzung von IL-18BP durch Interferon- $\gamma$  stellt den entscheidenden Schritt eines bislang unbekannten negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen Immunzellen und ortsständigen Nicht-Immunzellen dar: Nach der Freisetzung von IL-18 bei Entzündungen, Infektionen und Tumorerkrankungen führt das von Th1-, NK- und CD8<sup>+</sup>-Zellen produzierte Interferon- $\gamma$  zu einer Sekretion von IL-18BP durch Nicht-Immunzellen. Infolgedessen kommt es konsekutiv zur Limitierung der Aktivität von IL-18 mit Reduzierung seiner proinflammatorischen Wirkungen. Da ein Übermaß an IL-18

bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis und dem M. Chron eine Rolle zu spielen scheint, ist von besonderem Interesse welche natürlichen Wege für die Blockierung von IL-18 existieren. Die therapeutische Applikation von IL-18BP könnte sich in Zukunft als eine neue Strategie zur erfolgreichen Behandlung dieser Krankheiten erweisen.

Interleukin-18 Binding Protein (IL-18BP) is a newly described opponent of Interleukin-18 (IL-18) which neutralizes IL-18 and inhibits its biological functions by binding IL-18 with high affinity. As a pleiotropic cytokine of the immune system, IL-18 has been shown to contribute to the pathogenesis of inflammation, the protective host defense against infection as well as tumor regression. One of the major actions of IL-18 is the ability to induce the production and release of Interferon- $\gamma$  from T helper type 1 (Th1) cells, Natural Killer (NK) cells and CD8<sup>+</sup> cytotoxic cells.

IL-18BP has previously been described to be constitutively expressed and secreted. This study focuses on the regulation of IL-18BP gene expression in non-leukocytic cells. A semiquantitative RT-PCR method was established and minute constitutive levels of IL-18BP mRNA were detected in cultures of human renal mesangial cells, the colon carcinoma cell line DLD-1 and fibroblasts. More important, IL-18BP mRNA expression was strongly upregulated by Interferon- $\gamma$ . Using RNase Protection Assays 20 – 30fold relative inductions of IL-18BP mRNA levels following Interferon- $\gamma$  stimulation were observed. In cultures of human mesangial cells Lipopolysaccharide also increased IL-18BP expression. Furthermore, experiments with a new polyclonal antiserum against IL-18BP revealed that Interferon- $\gamma$  also mediates release of IL-18BP into cell culture supernatants. In addition, expression of IL-18BP was studied in cocultures of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with either human mesangial cells or DLD-1 cells. Activation of PBMCs by the combination of IL-12/IL-18 resulted in the production of endogenous Interferon- $\gamma$  detected by ELISA and was followed by the induction of IL-18BP gene expression in mesangial cells and DLD-1 cells. Finally, in separate experiments it was excluded that the regulation of IL-18BP is accompanied by changes in IL-18 expression. Whereas no expression of IL-18 was found in human mesangial cells, proIL-18 could be detected constitutively in DLD-1 cells. However, in DLD-1 cells Interferon- $\gamma$  did not regulate IL-18 expression.

This study demonstrates for the first time that IL-18BP is not only constitutively expressed but rather represents a specific regulated modulator of the immune system. Induction of the release of IL-18BP by Interferon- $\gamma$  seems to be part of a new negative feedback mechanism linking functions of immune cells and non-leukocytic cells: Release of active IL-18 during inflammation, infection and cancer is followed by production of Interferon- $\gamma$  by Th1-, NK- and CD8<sup>+</sup>-cells. Subsequently, Interferon- $\gamma$  induces secretion of IL-18BP from non-leukocytic cells, thereby limiting further IL-18 activity. Since IL-18 seems to be implicated in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases like rheumatoid arthritis or Chron's disease, understanding of the natural mechanisms for neutralizing this cytokine might prove to be crucial. In future, administration of IL-18BP might evolve as a new therapeutic strategy for the treatment of chronic inflammatory diseases.

## 6 Literatur

1. Belohradsky, B.H., *Primäre Immundefekte: Klinik, Immunologie u. Genetik*. 1986, Stuttgart: Verlag W. Kohlhammer GmbH.
2. Sepkowitz, K.A., *AIDS--the first 20 years*. N Engl J Med, 2001. **344**(23): p. 1764-72.
3. Janeway, C.A., Jr., et al., *Immunobiology - The immune system in health and disease*. Fourth ed. 1999: Elsevier Science Ltd / Garland Publishing.
4. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
5. Shevach, E.M., *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 389-400.
6. Shevach, E.M., et al., *Control of autoimmunity by regulatory T cells*. Adv Exp Med Biol, 2001. **490**: p. 21-32.
7. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
8. Gallucci, S. and P. Matzinger, *Danger signals: SOS to the immune system*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 114-9.
9. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
10. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
11. *The Cytokine Reference - A Comprehensive Guide to the Role of Cytokines in Health and Disease*, ed. J.J. Oppenheim and M. Feldmann. 2000, London: Academic Press.
12. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
13. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 411-52.
14. Mannel, D.N. and B. Echtenacher, *TNF in the inflammatory response*. Chem Immunol, 2000. **74**: p. 141-61.
15. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
16. Billiau, A., *Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis*. Adv Immunol, 1996. **62**: p. 61-130.
17. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
18. Muhl, H. and J. Pfeilschifter, *Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(9): p. 1247-55.
19. Tracey, K.J., et al., *Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia*. Nature, 1987. **330**(6149): p. 662-4.
20. Ploegh, H.L., *Viral strategies of immune evasion*. Science, 1998. **280**(5361): p. 248-53.
21. Seet, B.T. and G. McFadden, *Viral chemokine-binding proteins*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(1): p. 24-34.
22. McFadden, G., et al., *Virus-encoded receptors for cytokines and chemokines*. Semin Cell Dev Biol, 1998. **9**(3): p. 359-68.
23. Adcock, I.M., *Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions*. Pulm Pharmacol Ther, 2000. **13**(3): p. 115-26.
24. Feldmann, M. and R.N. Maini, *Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned?* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 163-96.
25. Akira, S., *The role of IL-18 in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 59-63.
26. Dinarello, C.A., *Interleukin-18*. Methods, 1999. **19**(1): p. 121-32.
27. Dinarello, C.A., *IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(1 Pt 1): p. 11-24.
28. Dinarello, C.A., et al., *Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(6): p. 658-64.
29. Nakanishi, K., et al., *Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 423-74.
30. Lebel-Binay, S., et al., *Interleukin-18: biological properties and clinical implications*. Eur Cytokine Netw, 2000. **11**(1): p. 15-26.
31. Nakamura, K., et al., *Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production*. Infect Immun, 1989. **57**(2): p. 590-5.
32. Okamura, H., et al., *A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock*. Infect Immun, 1995. **63**(10): p. 3966-72.
33. Okamura, H., et al., *Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells*. Nature, 1995. **378**(6552): p. 88-91.
34. Fantuzzi, G. and C.A. Dinarello, *Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1)*. J Clin Immunol, 1999. **19**(1): p. 1-11.
35. Gu, Y., et al., *Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme*. Science, 1997. **275**(5297): p. 206-9.

36. Ghayur, T., et al., *Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production*. Nature, 1997. **386**(6625): p. 619-23.
37. Tsutsui, H., et al., *Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice*. Immunity, 1999. **11**(3): p. 359-67.
38. Miwa, K., et al., *Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1287-92.
39. Akita, K., et al., *Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26595-603.
40. Pirhonen, J., et al., *Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7322-9.
41. Kohka, H., et al., *Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN-gamma in human peripheral blood mononuclear cells*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6640-6.
42. Sareneva, T., et al., *Influenza A virus-induced IFN-alpha/beta and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells*. J Immunol, 1998. **160**(12): p. 6032-8.
43. Torigoe, K., et al., *Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25737-42.
44. Born, T.L., et al., *Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29445-50.
45. Hoshino, K., et al., *Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5041-4.
46. Adachi, O., et al., *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 143-50.
47. Kanakaraj, P., et al., *Defective interleukin (IL)-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses in IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-deficient mice*. J Exp Med, 1999. **189**(7): p. 1129-38.
48. Thomas, J.A., et al., *Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 978-84.
49. Robinson, D., et al., *IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB*. Immunity, 1997. **7**(4): p. 571-81.
50. Kojima, H., et al., *Interleukin-18 activates the IRAK-TRAF6 pathway in mouse EL-4 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(1): p. 183-6.
51. Matsumoto, S., et al., *Interleukin-18 activates NF-kappaB in murine T helper type 1 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **234**(2): p. 454-7.
52. Shapiro, L., et al., *Interleukin 18 stimulates HIV type 1 in monocytic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12550-5.
53. Thomassen, E., et al., *Binding of interleukin-18 to the interleukin-1 receptor homologous receptor IL-1Rrp1 leads to activation of signaling pathways similar to those used by interleukin-1*. J Interferon Cytokine Res, 1998. **18**(12): p. 1077-88.
54. Tsuji-Takayama, K., et al., *Interleukin-18 induces activation and association of p56(lck) and MAPK in a murine TH1 clone*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(1): p. 126-30.
55. Kalina, U., et al., *IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-2*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1307-13.
56. Bohn, E., et al., *IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 299-307.
57. Sanchez-Bueno, A., et al., *Interferon-gamma-dependent expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-12, and interferon-gamma-inducing factor in macrophages elicited by allografted tumor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **224**(2): p. 555-63.
58. Brossart, P., et al., *Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 1998. **92**(11): p. 4238-47.
59. Stoll, S., et al., *Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development*. Eur J Immunol, 1998. **28**(10): p. 3231-9.
60. Puren, A.J., G. Fantuzzi, and C.A. Dinarello, (abstr.). Eur Cytokine Netw, 1998. **9**: p. 463.
61. Mileno, M.D., et al., *Coagulation of whole blood stimulates interleukin-1 beta gene expression*. J Infect Dis, 1995. **172**(1): p. 308-11.
62. Shapiro, L. and C.A. Dinarello, *Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production*. Exp Cell Res, 1997. **231**(2): p. 354-62.
63. Stoll, S., et al., *Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes*. J Immunol, 1997. **159**(1): p. 298-302.

64. Kampfer, H., et al., *Counterregulation of interleukin-18 mRNA and protein expression during cutaneous wound repair in mice*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(3): p. 369-74.
65. Takeuchi, M., et al., *Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor ("interleukin-18") in mouse intestinal epithelial cells*. Cell Tissue Res, 1997. **289**(3): p. 499-503.
66. Pages, F., et al., *Modulation of interleukin-18 expression in human colon carcinoma: consequences for tumor immune surveillance*. Int J Cancer, 1999. **84**(3): p. 326-30.
67. Cameron, L.A., et al., *Airway epithelium expresses interleukin-18*. Eur Respir J, 1999. **14**(3): p. 553-9.
68. Udagawa, N., et al., *Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1005-12.
69. Olee, T., et al., *IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses*. J Immunol, 1999. **162**(2): p. 1096-100.
70. Moller, B., et al., *Expression of interleukin-18 and its monokine-directed function in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2001. **40**(3): p. 302-9.
71. Conti, B., et al., *Cultures of astrocytes and microglia express interleukin 18*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **67**(1): p. 46-52.
72. Conti, B., et al., *Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex*. J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2035-7.
73. Conti, B., et al., *Modulation of IL-18 production in the adrenal cortex following acute ACTH or chronic corticosterone treatment*. Neuroimmunomodulation, 2000. **8**(1): p. 1-7.
74. Okamura, H., et al., *Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(3): p. 259-64.
75. Tsutsui, H., et al., *IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 3967-73.
76. Tomura, M., et al., *A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+ CD3- cells*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4738-46.
77. Hunter, C.A., et al., *Comparison of the effects of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma-inducing factor on the production of interferon-gamma by natural killer*. Eur J Immunol, 1997. **27**(11): p. 2787-92.
78. Tomura, M., et al., *Differential capacities of CD4+, CD8+, and CD4-CD8- T cell subsets to express IL-18 receptor and produce IFN-gamma in response to IL-18*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3759-65.
79. Berg, R.E., C.J. Cordes, and J. Forman, *Contribution of CD8+ T cells to innate immunity: IFN-gamma secretion induced by IL-12 and IL-18*. Eur J Immunol, 2002. **32**(10): p. 2807-16.
80. Yoshimoto, T., et al., *Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3948-53.
81. Yoshimoto, T., et al., *IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3400-7.
82. Ahn, H.J., et al., *A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma*. J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2125-31.
83. Tominaga, K., et al., *IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells*. Int Immunol, 2000. **12**(2): p. 151-60.
84. Yang, J., et al., *Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation*. Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 548-55.
85. Leite-De-Moraes, M.C., et al., *A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 5871-6.
86. Micallef, M.J., et al., *Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production*. Eur J Immunol, 1996. **26**(7): p. 1647-51.
87. Barbulescu, K., et al., *IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3642-7.
88. Szabo, S.J., et al., *Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling*. Immunity, 1995. **2**(6): p. 665-75.
89. Kojima, H., et al., *An essential role for NF-kappa B in IL-18-induced IFN-gamma expression in KG-1 cells*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5063-9.
90. Jacobson, N.G., et al., *Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1755-62.
91. Kaplan, M.H., et al., *Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 174-7.



92. Kunikata, T., et al., *Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody*. Cell Immunol, 1998. **189**(2): p. 135-43.
93. Chang, J.T., et al., *The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit*. Eur J Immunol, 2000. **30**(4): p. 1113-9.
94. Xu, D., et al., *Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells*. J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1485-92.
95. Puren, A.J., et al., *Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in human whole blood cultures*. J Infect Dis, 1998. **178**(6): p. 1830-4.
96. Matikainen, S., et al., *IFN-alpha and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma production in human NK cells: differential regulation of Stat4 activation and IFN-gamma gene expression by IFN-alpha and IL-12*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2236-45.
97. Takeda, K., et al., *Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 383-90.
98. Gu, Y., et al., *Interleukin-1 beta converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms in vivo*. Embo J, 1995. **14**(9): p. 1923-31.
99. Fantuzzi, G., et al., *Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice*. Blood, 1998. **91**(6): p. 2118-25.
100. Puren, A.J., et al., *Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells*. J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 711-21.
101. Hoshino, T., R.H. Wilttrout, and H.A. Young, *IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5070-7.
102. Yoshimoto, T., et al., *IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 132-7.
103. Yoshimoto, T., et al., *IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13962-6.
104. Ushio, S., et al., *Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein*. J Immunol, 1996. **156**(11): p. 4274-9.
105. Kohka, H., et al., *Interleukin-18/interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(4): p. 519-27.
106. Nold, M., et al., *IL-18 initiates release of matrix metalloproteinase-9 from peripheral blood mononuclear cells without affecting tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1: suppression by TNF alpha blockage and modulation by IL-10*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2003. **367**(1): p. 68-75.
107. Kohno, K., et al., *IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12*. J Immunol, 1997. **158**(4): p. 1541-50.
108. Swain, S.L., *Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response*. J Exp Med, 2001. **194**(3): p. F11-4.
109. Lauwerys, B.R., J.C. Renauld, and F.A. Houssiau, *Inhibition of in vitro immunoglobulin production by IL-12 in murine chronic graft-vs.-host disease: synergism with IL-18*. Eur J Immunol, 1998. **28**(6): p. 2017-24.
110. Hyodo, Y., et al., *IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1662-8.
111. Okamoto, I., et al., *Development of CD8+ effector T cells is differentially regulated by IL-18 and IL-12*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3202-11.
112. Dao, T., et al., *Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells*. Cell Immunol, 1996. **173**(2): p. 230-5.
113. Dao, T., W.Z. Mehal, and I.N. Crispe, *IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2217-22.
114. Kohyama, M., et al., *Direct activation of human CD8+ cytotoxic T lymphocytes by interleukin-18*. Jpn J Cancer Res, 1998. **89**(10): p. 1041-6.
115. Magram, J., et al., *IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses*. Immunity, 1996. **4**(5): p. 471-81.
116. Hoshino, T., et al., *In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 cytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4+ T cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(7): p. 1998-2006.
117. Wild, J.S., et al., *IFN-gamma-inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2701-10.
118. Kobayashi, K., et al., *Decreased expression of cytokines that induce type 1 helper T cell/interferon-gamma responses in genetically susceptible mice infected with Mycobacterium avium*. Clin Immunol Immunopathol, 1997. **85**(1): p. 112-6.

119. Kobayashi, K., et al., *The possible role of interleukin (IL)-12 and interferon-gamma-inducing factor/IL-18 in protection against experimental Mycobacterium leprae infection in mice*. Clin Immunol Immunopathol, 1998. **88**(3): p. 226-31.
120. Sugawara, I., et al., *Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2585-9.
121. Mastroeni, P., et al., *Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent Salmonella typhimurium*. Infect Immun, 1999. **67**(2): p. 478-83.
122. Lu, H., C. Shen, and R.C. Brunham, *Chlamydia trachomatis infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1463-9.
123. Zhang, T., et al., *Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against Cryptococcus neoformans through production of gamma interferon by natural killer cells*. Infect Immun, 1997. **65**(9): p. 3594-9.
124. Qureshi, M.H., et al., *Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection with Cryptococcus neoformans*. Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 643-9.
125. Kawakami, K., et al., *Role of TNF-alpha in the induction of fungicidal activity of mouse peritoneal exudate cells against Cryptococcus neoformans by IL-12 and IL-18*. Cell Immunol, 1999. **193**(1): p. 9-16.
126. Kawakami, K., et al., *IL-18 contributes to host resistance against infection with Cryptococcus neoformans in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN-gamma production by NK cells*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 941-7.
127. Brummer, E., *Human defenses against Cryptococcus neoformans: an update*. Mycopathologia, 1998. **143**(3): p. 121-5.
128. Kawakami, K., et al., *IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with Cryptococcus neoformans by inducing IFN-gamma production*. J Immunol, 1997. **159**(11): p. 5528-34.
129. Choi, H.J., C.A. Dinarello, and L. Shapiro, *Interleukin-18 inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in peripheral blood mononuclear cells*. J Infect Dis, 2001. **184**(5): p. 560-8.
130. Klein, S.A., et al., *Interleukin-18 stimulates HIV-1 replication in a T-cell line*. Eur Cytokine Netw, 2000. **11**(1): p. 47-52.
131. Fujioka, N., et al., *Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type 1 infection*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2401-9.
132. Tanaka-Kataoka, M., et al., *In vivo antiviral effect of interleukin 18 in a mouse model of vaccinia virus infection*. Cytokine, 1999. **11**(8): p. 593-9.
133. Micallef, M.J., et al., *In vivo antitumor effects of murine interferon-gamma-inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites*. Cancer Immunol Immunother, 1997. **43**(6): p. 361-7.
134. Micallef, M.J., et al., *Interleukin 18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma*. Cancer Res, 1997. **57**(20): p. 4557-63.
135. Kikuchi, T., et al., *Antitumor activity of interleukin-18 on mouse glioma cells*. J Immunother, 2000. **23**(2): p. 184-9.
136. Osaki, T., et al., *IFN-gamma-inducing factor/IL-18 administration mediates IFN-gamma- and IL-12-independent antitumor effects*. J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1742-9.
137. Cho, D., et al., *Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates*. Cancer Res, 2000. **60**(10): p. 2703-9.
138. Vidal-Vanaclocha, F., et al., *IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 734-9.
139. Coughlin, C.M., et al., *Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis*. J Clin Invest, 1998. **101**(6): p. 1441-52.
140. Heuer, J.G., C. Tucker-McClung, and R.A. Hock, *Neuroblastoma cells expressing mature IL-18, but not proIL-18, induce a strong and immediate antitumor immune response*. J Immunother, 1999. **22**(4): p. 324-35.
141. Osaki, T., et al., *Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18)*. Gene Ther, 1999. **6**(5): p. 808-15.
142. Oshikawa, K., et al., *Synergistic inhibition of tumor growth in a murine mammary adenocarcinoma model by combinational gene therapy using IL-12, pro-IL-18, and IL-1beta converting enzyme cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13351-6.
143. Wigginton, J.M., et al., *Synergistic engagement of an ineffective endogenous anti-tumor immune response and induction of IFN-gamma and Fas-ligand-dependent tumor eradication by combined administration of IL-18 and IL-2*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4467-74.
144. Yamanaka, K., et al., *Synergistic antitumor effects of interleukin-12 gene transfer and systemic administration of interleukin-18 in a mouse bladder cancer model*. Cancer Immunol Immunother, 1999. **48**(6): p. 297-302.

145. Nagai, H., et al., *Antitumor effects on mouse melanoma elicited by local secretion of interleukin-12 and their enhancement by treatment with interleukin-18*. Cancer Invest, 2000. **18**(3): p. 206-13.
146. Nakamura, S., et al., *IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms in adverse effects caused by concomitant administration of IL-18 and IL-12*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3330-6.
147. Chikano, S., et al., *IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner*. Gut, 2000. **47**(6): p. 779-86.
148. Cao, R., et al., *Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor*. Faseb J, 1999. **13**(15): p. 2195-202.
149. Gracie, J.A., et al., *A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 1999. **104**(10): p. 1393-401.
150. Leung, B.P., et al., *Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen-induced arthritis*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6495-502.
151. Wei, X.Q., et al., *Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 517-21.
152. Pittoni, V., et al., *Anti-tumour necrosis factor (TNF) alpha treatment of rheumatoid arthritis (infliximab) selectively down regulates the production of interleukin (IL) 18 but not of IL12 and IL13*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(8): p. 723-5.
153. Plater-Zyberk, C., et al., *Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis*. J Clin Invest, 2001. **108**(12): p. 1825-32.
154. Pizarro, T.T., et al., *IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells*. J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6829-35.
155. Monteleone, G., et al., *Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease*. J Immunol, 1999. **163**(1): p. 143-7.
156. Kanai, T., et al., *Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease*. Gastroenterology, 2001. **121**(4): p. 875-88.
157. Wirtz, S., et al., *Treatment of T cell-dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 411-20.
158. Wildbaum, G., et al., *Neutralizing antibodies to IFN-gamma-inducing factor prevent experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6368-74.
159. Shi, F.D., et al., *IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3099-104.
160. Balashov, K.E., et al., *CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6873-8.
161. Losy, J. and A. Niezgod, *IL-18 in patients with multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 2001. **104**(3): p. 171-3.
162. Furlan, R., et al., *Peripheral levels of caspase-1 mRNA correlate with disease activity in patients with multiple sclerosis; a preliminary study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999. **67**(6): p. 785-8.
163. Furlan, R., et al., *Caspase-1 regulates the inflammatory process leading to autoimmune demyelination*. J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2403-9.
164. Grobmyer, S.R., et al., *Elevation of IL-18 in human sepsis*. J Clin Immunol, 2000. **20**(3): p. 212-5.
165. Endo, S., et al., *Interleukin 18 (IL-18) levels in patients with sepsis*. J Med, 2000. **31**(1-2): p. 15-20.
166. Emmanuilidis, K., et al., *Differential regulation of systemic IL-18 and IL-12 release during postoperative sepsis: high serum IL-18 as an early predictive indicator of lethal outcome*. Shock, 2002. **18**(4): p. 301-5.
167. Netea, M.G., et al., *Neutralization of IL-18 reduces neutrophil tissue accumulation and protects mice against lethal Escherichia coli and Salmonella typhimurium endotoxemia*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2644-9.
168. Remick, D.G., G.E. Bolgos, and J. Siddiqui, *Inflammatory status in sepsis alters efficacy of interleukin-18 binding protein therapy*. Crit Care Med, 2003. **31**(8): p. 2096-101.
169. Tsutsui, H., et al., *IL-18 accounts for both TNF-alpha- and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice*. J Immunol, 1997. **159**(8): p. 3961-7.
170. McGuinness, P.H., et al., *Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection*. Gut, 2000. **46**(2): p. 260-9.
171. Wang, B., et al., *Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13844-9.
172. Pakala, S.V., et al., *In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1999. **189**(7): p. 1053-62.
173. Pukel, C., H. Baquerizo, and A. Rabinovitch, *Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1*. Diabetes, 1988. **37**(1): p. 133-6.

174. Mandrup-Poulsen, T., et al., *Human tumor necrosis factor potentiates human interleukin 1-mediated rat pancreatic beta-cell cytotoxicity*. J Immunol, 1987. **139**(12): p. 4077-82.
175. Rothe, H., et al., *Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGF, which is located near Idd2*. J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 469-74.
176. Rothe, H., et al., *IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1230-6.
177. Hofstra, C.L., et al., *Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels*. J Immunol, 1998. **161**(9): p. 5054-60.
178. Hansen, G., et al., *Vaccination with heat-killed Listeria as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8+ T cells and IL-18*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 223-30.
179. Kodama, T., et al., *IL-18 deficiency selectively enhances allergen-induced eosinophilia in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(1 Pt 1): p. 45-53.
180. Campbell, E., et al., *Differential roles of IL-18 in allergic airway disease: induction of eotaxin by resident cell populations exacerbates eosinophil accumulation*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 1096-102.
181. Kumano, K., et al., *Interleukin-18 enhances antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(3): p. 873-8.
182. Gangemi, S., et al., *Serum levels of interleukin-18 and s-ICAM-1 in patients affected by psoriasis: preliminary considerations*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2003. **17**(1): p. 42-6.
183. Naik, S.M., et al., *Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(5): p. 766-72.
184. Ohta, Y., Y. Hamada, and K. Katsuoka, *Expression of IL-18 in psoriasis*. Arch Dermatol Res, 2001. **293**(7): p. 334-42.
185. Fujimori, Y., et al., *Elevated interleukin (IL)-18 levels during acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation*. Br J Haematol, 2000. **109**(3): p. 652-7.
186. Hu, H.Z., et al., *Kinetics of interferon-gamma secretion and its regulatory factors in the early phase of acute graft-versus-host disease*. Immunology, 1999. **98**(3): p. 379-85.
187. Nakamura, H., et al., *Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12, IL-18, and IFN-gamma in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(1 Pt 2): p. S45-50.
188. Wong, C.K., et al., *Elevated production of interleukin-18 is associated with renal disease in patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Immunol, 2002. **130**(2): p. 345-51.
189. Matsumoto, K. and K. Kanmatsuse, *Elevated interleukin-18 levels in the urine of nephrotic patients*. Nephron, 2001. **88**(4): p. 334-9.
190. Kitching, A.R., et al., *IL-18 has IL-12-independent effects in delayed-type hypersensitivity: studies in cell-mediated crescentic glomerulonephritis*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4649-57.
191. Novick, D., et al., *Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 127-36.
192. Aizawa, Y., et al., *Cloning and expression of interleukin-18 binding protein*. FEBS Lett, 1999. **445**(2-3): p. 338-42.
193. Kim, S.H., et al., *Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1190-5.
194. Xiang, Y. and B. Moss, *IL-18 binding and inhibition of interferon gamma induction by human poxvirus-encoded proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11537-42.
195. Born, T.L., et al., *A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3246-54.
196. Calderara, S., Y. Xiang, and B. Moss, *Orthopoxvirus IL-18 binding proteins: affinities and antagonist activities*. Virology, 2001. **279**(1): p. 22-6.
197. Smith, V.P., N.A. Bryant, and A. Alcamí, *Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 5): p. 1223-30.
198. Symons, J.A., et al., *The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 11): p. 2833-44.
199. Gottlieb, S.L. and P.L. Myskowski, *Molluscum contagiosum*. Int J Dermatol, 1994. **33**(7): p. 453-61.
200. Heng, M.C., et al., *Lack of host cellular immune response in eruptive molluscum contagiosum*. Am J Dermatopathol, 1989. **11**(3): p. 248-54.
201. Arend, W.P., et al., *Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids*. J Immunol, 1994. **153**(10): p. 4766-74.

202. Terlizze, M., P. Simoni, and F. Antonetti, *In vitro comparison of inhibiting ability of soluble TNF receptor p75 (TBP II) vs. soluble TNF receptor p55 (TBP I) against TNF-alpha and TNF-beta*. J Interferon Cytokine Res, 1996. **16**(12): p. 1047-53.
203. Dinarello, C.A. and G. Fantuzzi, *Interleukin-18 and host defense against infection*. J Infect Dis, 2003. **187** Suppl 2: p. S370-84.
204. Mosley, B., et al., *The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms*. Cell, 1989. **59**(2): p. 335-48.
205. Aderka, D., et al., *Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors*. J Exp Med, 1992. **175**(2): p. 323-9.
206. Kleinert, H., et al., *Involvement of protein kinases in the induction of NO synthase II in human DLD-1 cells*. Br J Pharmacol, 1998. **123**(8): p. 1716-22.
207. Uciechowski, P., et al., *IFN-gamma induces the high-affinity Fc receptor I for IgG (CD64) on human glomerular mesangial cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2928-35.
208. Banas, B., et al., *Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(11): p. 2314-22.
209. Dieffenbach, C.W., T.M.J. Lowe, and G.S. Dveksler, *General Concepts for PCR Primer Design*, in *PCR Primer, A Laboratory Manual*, G.S. Dveksler, Editor. 1995, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 133-155.
210. Kampfer, H., *Wound inflammation: expression, regulation and function of selected mediators during skin repair*, in *Fachbereich Biologie und Informatik*. 2001, Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main: Frankfurt. p. 33-35.
211. Tokunaga, K., et al., *Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers*. Cancer Res, 1987. **47**(21): p. 5616-9.
212. Schlondorff, D., *The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte*. FASEB J, 1987. **1**(4): p. 272-81.
213. Schlondorff, D., *Roles of the mesangium in glomerular function*. Kidney Int, 1996. **49**(6): p. 1583-5.
- 213a. Pfeilschifter, J., *Cross-talk between transmembrane signalling systems: a prerequisite for the delicate regulation of glomerular haemodynamics by mesangial cells*. Eur J Clin Invest, 1989. **19**(4): p. 347-61.
214. Stockand, J.D. and S.C. Sansom, *Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction*. Physiol Rev, 1998. **78**(3): p. 723-44.
215. Pfeilschifter, J., D. Kunz, and H. Muhl, *Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells*. Nephron, 1993. **64**(4): p. 518-25.
216. Pfeilschifter, J., *Nitric oxide triggers the expression of proinflammatory and protective gene products in mesangial cells and the inflamed glomerulus*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(3): p. 347-8.
217. Sterzel, R.B., E. Schulze-Lohoff, and M. Marx, *Cytokines and mesangial cells*. Kidney Int Suppl, 1993. **39**: p. S26-31.
218. Radeke, H.H. and K. Resch, *The inflammatory function of renal glomerular mesangial cells and their interaction with the cellular immune system*. Clin Invest, 1992. **70**(9): p. 825-42.
219. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, ed. H. Hahn, et al. 1999: Springer-Verlag. 29-31, 177-178.
220. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.
221. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. **343**(5): p. 338-44.
222. Zhang, G. and S. Ghosh, *Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors*. J Endotoxin Res, 2000. **6**(6): p. 453-7.
223. Guha, M. and N. Mackman, *LPS induction of gene expression in human monocytes*. Cell Signal, 2001. **13**(2): p. 85-94.
224. Hoffmann, E., et al., *Multiple control of interleukin-8 gene expression*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(5): p. 847-55.
225. Galanos, C., et al., *Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities*. Eur J Biochem, 1985. **148**(1): p. 1-5.
226. Rietschel, E.T., et al., *Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function*. FASEB J, 1994. **8**(2): p. 217-25.
227. Kusner, D.J., et al., *Cytokine- and LPS-induced synthesis of interleukin-8 from human mesangial cells*. Kidney Int, 1991. **39**(6): p. 1240-8.
228. Brown, Z., et al., *Cytokine-activated human mesangial cells generate the neutrophil chemoattractant, interleukin 8*. Kidney Int, 1991. **40**(1): p. 86-90.
229. Moller, B., et al., *Prednisolone induces interleukin-18 expression in mononuclear blood and myeloid progenitor cells*. Inflamm Res, 2002. **51**(9): p. 457-63.
230. Kristo, C., et al., *Raised serum levels of interleukin-8 and interleukin-18 in relation to bone metabolism in endogenous Cushing's syndrome*. Eur J Endocrinol, 2002. **146**(3): p. 389-95.

231. Moustakas, A., et al., *Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation*. Immunol Lett, 2002. **82**(1-2): p. 85-91.
232. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, *Regulation of immune responses by TGF-beta*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 137-61.
233. Kulkarni, A.B., et al., *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 770-4.
234. Hayashi, H., et al., *TGFbeta down-regulates IFN-gamma production in IL-18 treated NK cell line LNK5E6*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(4): p. 980-5.
235. Espevik, T., et al., *Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta*. J Exp Med, 1987. **166**(2): p. 571-6.
236. Wallach, D., et al., *Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 331-67.
237. Ponton, A., M.V. Clement, and I. Stamenkovic, *The CD95 (APO-1/Fas) receptor activates NF-kappaB independently of its cytotoxic function*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8991-5.
238. Park, D.R., et al., *Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 6209-16.
239. Watanabe-Fukunaga, R., et al., *The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen*. J Immunol, 1992. **148**(4): p. 1274-9.
240. Bussolati, B., et al., *Interleukin-12 is synthesized by mesangial cells and stimulates platelet-activating factor synthesis, cytoskeletal reorganization, and cell shape change*. Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 623-32.
241. Gately, M.K., et al., *The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 495-521.
242. Nakamura, K., et al., *Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production*. Infect Immun, 1993. **61**(1): p. 64-70.
243. Gerdes, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis*. J Exp Med, 2002. **195**(2): p. 245-57.
244. Paulukat, J., et al., *Expression and release of IL-18 binding protein in response to IFN-gamma*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 7038-43.
245. Muhl, H., et al., *Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleukocytic cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(3): p. 960-3.
246. Yoshino, O., et al., *Evidence for the expression of interleukin (IL)-18, IL-18 receptor and IL-18 binding protein in the human endometrium*. Mol Hum Reprod, 2001. **7**(7): p. 649-54.
247. Hurgin, V., D. Novick, and M. Rubinstein, *The promoter of IL-18 binding protein: activation by an IFN-gamma-induced complex of IFN regulatory factor 1 and CCAAT/enhancer binding protein beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16957-62.
248. Moller, B., et al., *Interferon-gamma induces expression of interleukin-18 binding protein in fibroblast-like synoviocytes*. Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(3): p. 442-5.
249. Corbaz, A., et al., *IL-18-binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated during active Crohn's disease*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3608-16.
250. Veenstra, K.G., et al., *IL-12 induces monocyte IL-18 binding protein expression via IFN-gamma*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2282-7.
251. Fantuzzi, G., et al., *Role of interferon regulatory factor-1 in the regulation of IL-18 production and activity*. Eur J Immunol, 2001. **31**(2): p. 369-75.
252. Novick, D., et al., *A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18*. Cytokine, 2001. **14**(6): p. 334-42.
253. Ju, D.W., et al., *Interleukin 18 transfection enhances antitumor immunity induced by dendritic cell-tumor cell conjugates*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3735-40.
254. Ramani, P. and F.R. Balkwill, *Enhanced metastases of a mouse carcinoma after in vitro treatment with murine interferon gamma*. Int J Cancer, 1987. **40**(6): p. 830-4.
255. Dong, H., et al., *Gene expression profile analysis of the mouse liver during bacteria-induced fulminant hepatitis by a cDNA microarray system*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **298**(5): p. 675-86.
256. Wheeler, R.D., et al., *Up-regulation of IL-18BP, but not IL-18 mRNA in rat liver by LPS*. Cytokine, 2003. **21**(4): p. 161-6.
257. Andersson, J., et al., *Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell*. Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2617-23.
258. Smith, M.F., Jr., et al., *Human IL-1 receptor antagonist promoter. Cell type-specific activity and identification of regulatory regions*. J Immunol, 1992. **149**(6): p. 2000-7.

259. Arend, W.P., et al., *IL-1 receptor antagonist and IL-1 beta production in human monocytes are regulated differently*. J Immunol, 1991. **147**(5): p. 1530-6.
260. Granowitz, E.V., et al., *Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia*. Lancet, 1991. **338**(8780): p. 1423-4.
261. Wachtershauser, A. and J. Stein, *Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases*. Eur J Nutr, 2000. **39**(4): p. 164-71.
262. Kanai, T., et al., *Interleukin 18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1514-23.
263. Pages, F., et al., *Analysis of interleukin-18, interleukin-1 converting enzyme (ICE) and interleukin-18-related cytokines in Crohn's disease lesions*. Eur Cytokine Netw, 2001. **12**(1): p. 97-104.
264. Bresnihan, B., et al., *Serum interleukin 18 and interleukin 18 binding protein in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(8): p. 726-9.
265. Kawashima, M., et al., *Levels of interleukin-18 and its binding inhibitors in the blood circulation of patients with adult-onset Still's disease*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(3): p. 550-60.
266. Takubo, T., et al., *Human IL-18 bioactivity in hematological malignancies with highly elevated serum IL-18 levels*. Acta Haematol, 2000. **103**(3): p. 162-4.
267. Ludwiczek, O., et al., *Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-18 binding protein are elevated in patients with chronic liver disease*. J Clin Immunol, 2002. **22**(6): p. 331-7.
268. Zecchina, G., et al., *Interleukin-18 Binding Protein in Acute Graft versus Host Disease and Engraftment Following Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplants*. J Hematother Stem Cell Res, 2001. **10**(6): p. 769-76.
269. Kim, S.H., et al., *Site-specific mutations in the mature form of human IL-18 with enhanced biological activity and decreased neutralization by IL-18 binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3304-9.
270. Mendoza, L., et al., *Hydrogen peroxide mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression from interleukin-18-activated hepatic sinusoidal endothelium: implications for circulating cancer cell arrest in the murine liver*. Hepatology, 2001. **34**(2): p. 298-310.
271. Ekmekcioglu, S., et al., *Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(12): p. 4768-75.
272. Ambs, S., et al., *Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression*. Cancer Res, 1998. **58**(2): p. 334-41.
273. Carrascal, M.T., et al., *Interleukin-18 binding protein reduces b16 melanoma hepatic metastasis by neutralizing adhesiveness and growth factors of sinusoidal endothelium*. Cancer Res, 2003. **63**(2): p. 491-7.
274. Faggioni, R., et al., *IL-18-binding protein protects against lipopolysaccharide- induced lethality and prevents the development of Fas/Fas ligand-mediated models of liver disease in mice*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5913-20.
275. Marshall, J.C., *Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(5): p. 391-405.
276. Remick, D.G., et al., *Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days*. Shock, 2002. **17**(6): p. 463-7.
277. Reading, P.C. and G.L. Smith, *Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity*. J Virol, 2003. **77**(18): p. 9960-8.
278. Mallat, Z., et al., *Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability*. Circ Res, 2001. **89**(7): p. E41-5.
279. Mallat, Z., et al., *Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates ischemia-induced neovascularization in mice hindlimb*. Circ Res, 2002. **91**(5): p. 441-8.
280. Pomerantz, B.J., et al., *Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2871-6.
281. Ten Hove, T., et al., *Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice*. Gastroenterology, 2001. **121**(6): p. 1372-9.
282. Sivakumar, P.V., et al., *Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage*. Gut, 2002. **50**(6): p. 812-20.
283. Banda, N.K., et al., *Mechanisms of inhibition of collagen-induced arthritis by murine IL-18 binding protein*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2100-5.
284. Smeets, R.L., et al., *Adenoviral delivery of IL-18 binding protein C ameliorates Collagen-Induced Arthritis in mice*. Gene Ther, 2003. **10**(12): p. 1004-11.
285. <http://www.serono.com/pipeline/pipeline.jsp?major=2>. 2003, Serono International S. A., Genf, Schweiz.

- 286. Gomez-Reino, J.J., et al., *Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(8): p. 2122-7.
- 287. Gardam, M.A., et al., *Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(3): p. 148-55.
- 288. Xiang, Y. and B. Moss, *Molluscum contagiosum virus interleukin-18 (IL-18) binding protein is secreted as a full-length form that binds cell surface glycosaminoglycans through the C-terminal tail and a furin-cleaved form with only the IL-18 binding domain*. J Virol, 2003. **77**(4): p. 2623-30.



# 7 Anhang

## 7.1 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter für die freundliche Aufnahme in das Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, das Interesse an meinem Projekt, für seine Anteilnahme, Hilfe und seinen Rat sowie schließlich für die Bereitstellung der Laborräume und der finanziellen Möglichkeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich Dr. rer. nat. Heiko Mühl für seine hervorragende und lückenlose Betreuung meiner Arbeit, die Auswahl des Themas sowie die Einarbeitung in wissenschaftliche Denk-, Vorgehensweisen und die Labormethoden.

Sein Engagement, Ideenreichtum und das angenehme Arbeitsklima hat zweifellos wesentlich zum Erfolg des Projekts beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei ihm für die Gelegenheiten bedanken, unsere Ergebnisse beim „Work-in-Progress“ des Instituts und bei der Institutstagung in Rauischholzhausen vortragen zu dürfen.

Dr. Heiko Kämpfer und PD Dr. Stefan Frank danke ich recht herzlich für die erfolgreiche Kollaboration mit unserer Arbeitsgruppe und den ständigen Gedankenaustausch.

Darüber hinaus bin ich Dr. Heiko Kämpfer sehr dankbar für die Hilfe bei den RNase Protection Assays und Dr. Jens Paulukat für das Einarbeiten in die Western Blot Methode.

Auch sonst möchte ich Dr. Jens Paulukat und Markus Hellmuth für ihre vielen kleinen Hilfestellungen im Labor danken.

Den entsprechenden Mitarbeitern unseres Instituts danke ich für ihre Blutspende und andererseits den Ärzten des Instituts für Klinische Pharmakologie für die Blutentnahme.

Vielen Dank an Prof. Dr. H. Radeke und seine Mitarbeiter für die Isolierung und das zur Verfügung stellen der primären humanen Mesangiumzellen.

Vielen Dank auch an Dr. Meik Behrens für seinen Erfahrungsaustausch beim „Trouble-shooting“ bezüglich des *Genome Walker™ Kits*, auch wenn dieses Projekt bislang keine Früchte tragen konnte.

In ganz anderer Hinsicht danke ich meinen Eltern, meinen beiden Schwestern Corinna und Bettina sowie Bettinas Ehemann Falko für ihren Rückhalt und ihre immer gegenwärtige Unterstützung.

Eine ganz außergewöhnliche Hochachtung gebührt insbesondere meinen Eltern. Nicht zuletzt ohne ihre großzügige finanzielle Unterstützung meines Studiums, wäre der enorme Zeitaufwand für diese Arbeit nur schwer möglich gewesen.

Weiterhin danke ich meinem Vertrauensdozenten Prof. Dr. H. Fueß für seine Unterstützung bei der Anerkennung meines Forschungssemesters und Verlängerung der Förderungszeit durch die *Studienstiftung des deutschen Volkes*.

Allen genannten und ungenannten Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit...

### 7.2 Wissenschaftliche Publikationen

Teilinhalte dieser Dissertation wurden wie folgt veröffentlicht:

Muhl, H., Kampfer, H., **Bosmann, M.**, Frank, S., Radeke, H., and Pfeilschifter, J. (2000). Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleucocytic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 267, 960-963.

Paulukat J., **Bosmann M.**, Nold M., Garkisch S., Kampfer H., Frank S., Raedle J., Zeuzem S., Pfeilschifter J., and Muhl H. (2001). Expression and release of IL-18 binding protein in response to Interferon-gamma. *Journal of Immunology*. 167, 7038-7043.

### 7.3 Lebenslauf

**Name:** Markus Bosmann  
**Adresse:** Goethe Str. 12  
64546 Walldorf  
Deutschland  
*tel.:* 06105-951308  
*e-mail:* markus@bosmann.de  
**Geburtstag:** 03.07.1977  
**Staats-  
angehörigkeit:** deutsch  
**Familienstand:** ledig

#### Schulische Ausbildung & Qualifikationen:

1983-1987 Christian-Bitter-Schule (Grundschule), Melsungen  
1987-1993 Gesamtschule (Förderstufe und Gymnasialzweig), Melsungen  
08/1993-06/1996 Geschwister-Scholl-Schule (Oberstufengymnasium), Melsungen  
Leistungskurse: Biologie und Chemie (Abiturdurchschnittsnote -1,0-)  
07/1996-04/1997 Grundwehrdienst bei der Bundeswehr mit Ausbildung zum Tastfunker,  
Fernmelderegiment 320, Frankenberg

#### Medizinische Ausbildung:

04/1997 Immatrikulation zum Studium der Humanmedizin an der Johann  
Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
08/1997-09/1997 Krankenpflegepraktikum, Wexham Park Hospital, Slough, England  
03/1999 Ärztliche Vorprüfung (Note -1,0-)  
07/1999 Famulatur in der Medizinischen Klinik I, Universitätsklinikum Großhadern,  
München  
08/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note -1-)  
03/2001 Famulatur in der Radiologischen Gemeinschaftspraxis Offenbach  
02/2002 Famulatur in der Division of Renal Diseases & Hypertension, Department  
of Medicine, George Washington University, Washington D.C., USA  
03/2002 Famulatur in der Division of Gastroenterology, Department of Medicine,  
Johns Hopkins University, Baltimore, USA  
09/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note -2,0-)  
10/2003-12/2003 Praktisches Jahr im Zentrum der Radiologie, Klinikum der Johann  
Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

01/2004-02/2004      Praktisches Jahr im Department of Radiology, Duke University, Durham, USA

### Forschungserfahrungen:

08/1999-03/2000      Forschungssemester im *pharmazentrum frankfurt*, Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

08/2001-01/2002      Forschungsaufenthalt in der Liver Diseases Section, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, USA

### Ehrungen & Auszeichnungen:

1996                      Auszeichnung für die beste Abiturnote der Geschwister-Scholl-Schule, Melsungen

11/1999                Aufnahme als Stipendiat in die Studienstiftung des deutschen Volkes

2001/2002            Teilnehmer des Academic Year Program, Biomedical Sciences Exchange Program between North America and Europe Inc.

08/2001-01/2002    Stipendium der National Institutes of Health: 4.800 \$  
Auslandsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes: 4.200 €

01/2004                Reisestipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes: 1.000 €

### Wissenschaftliche Publikationen:

1. Muhl, H., Kampfer, H., **Bosmann, M.**, Frank, S., Radeke, H., and Pfeilschifter, J. (2000). Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleucocytic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 267, 960-963.
2. Muhl, H., Chang, J. H., Huwiler, A., **Bosmann, M.**, Paulukat, J., Ninic, R., Nold, M., Hellmuth, M., and Pfeilschifter, J. (2000). Nitric oxide augments release of chemokines from monocytic U937 cells: modulation by antiinflammatory pathways. *Free Radical Biology and Medicine*. 29, 969-980.
3. Paulukat J., **Bosmann M.**, Nold M., Garkisch S., Kampfer H., Frank S., Raedle J., Zeuzem S., Pfeilschifter J., and Muhl H. (2001). Expression and release of IL-18 binding protein in response to Interferon-gamma. *Journal of Immunology*. 167, 7038-7043.
4. Nascimbeni M., Mizukoshi E., **Bosmann M.**, Major M., Mihalik K., Rice C.M., Feinstone S.M., and Rehermann B., (2003). Kinetics of CD4+ and CD8+ memory T cell responses during hepatitis C virus rechallenge of recovered chimpanzees. *Journal of Virology*. 77, 4781-4793.

Frankfurt, den 15.02.2004



Markus Bosmann

## 7.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

### „Untersuchung über die Regulation der Genexpression von Interleukin-18-Bindungsprotein und Interleukin-18“

im *pharmazentrum frankfurt*, Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter mit Unterstützung durch Dr. rer. nat. H. Mühl ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

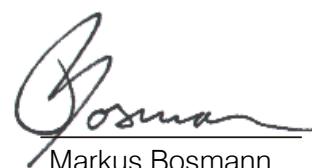
Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Muhl, H., Kampfer, H., **Bosmann, M.**, Frank, S., Radeke, H., and Pfeilschifter, J. (2000). Interferon-gamma mediates gene expression of IL-18 binding protein in nonleucocytic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 267, 960-963.

Paulukat J., **Bosmann M.**, Nold M., Garkisch S., Kampfer H., Frank S., Raedle J., Zeuzem S., Pfeilschifter J., and Muhl H. (2001). Expression and release of IL-18 binding protein in response to Interferon-gamma. *Journal of Immunology*. 167, 7038-7043.

Frankfurt, den 15.02.2004



Markus Bosmann